

**Bedeutung von Leber und intestinaler Mukosa für die Aktivierung und Funktion von
T-Lymphozyten im murinen Infektionsmodell**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Nathalie Jänner

geb. am 24.10.1977 in Hamburg

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Christian Limberg

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker
2. Prof. Dr. Richard Lucius
3. Prof. Dr. Stefan Kaufmann

Tag der mündlichen Prüfung: 24.04.07

Zusammenfassung

Konventionelle TZR $\alpha\beta^+$ CD8 $\alpha\beta^+$ T-Zellen im intestinalen Epithel unterscheiden sich phänotypisch und funktionell von T-Zellen gleicher Spezifität in anderen Organen. Darüber hinaus können nach einer iv Infektion mit *Listeria monocytogenes* (Lm) hohe Frequenzen Lm-spezifischer T-Zellen aus der Dünndarmmukosa isoliert werden, obwohl nach iv Infektion nur sporadisch Lm in dieses Gewebe gelangen. Ein Ziel dieser Arbeit war es, intestinale intraepitheliale CD8 $^+$ T-Zellen detaillierter zu charakterisieren. Es sollten Mechanismen identifiziert werden, welche die Migration von T-Zellen in intestinale Gewebe bestimmen und/oder welche die funktionelle Adaption der T-Zellen an diese mukosale Umgebung beeinflussen. Hierfür wurden Mäuse mit einem rekombinanten Lm-Stamm (LmOVA), der eine verkürzte Form des Ovalbumin Proteins sekretiert, infiziert. OVA-spezifische CD8 $^+$ T-Zellen wurden aus der Milz und dem intestinalem Epithel isoliert, und die mRNA-Expressionsprofile dieser Zellen wurden mittels einer Mikroarray-Analyse verglichen. CD8 $^+$ T-Zellen gleicher Antigenspezifität aus Milz und Dünndarm wiesen ein klar unterschiedliches mRNA/Gen-Expressionsprofil auf. Eine Gruppe dieser unterschiedlich stark exprimierten Gene kodierte für NK-Rezeptoren, welche normalerweise von NK-Zellen und von aktivierten CD8 $^+$ T-Zellen exprimiert werden. Diese NK-Rezeptoren zeigten auf Listerien-spezifischen CD8 $^+$ T-Zellen aus der intestinalen Mukosa eine wesentlich geringere Expression als auf entsprechenden Zellen aus der Milz. Durchflusszytometrische Analysen ergaben, dass dieser Unterschied nach einer oralen Infektion wesentlich stärker ausgeprägt war, als nach einer intravenösen Infektion. Die Präsenz der natürlichen Darmflora hatte nur einen sehr geringen Einfluss auf die organspezifisch unterschiedliche NK-Rezeptor-Expression in CD8 $^+$ T-Zellen. Untersuchungen in transgenen CD4dnTGF β RII Mäusen, in denen T-Zellen einen Defekt in der TGF β -Signaltransduktion haben, wiesen auf TGF β als ein entscheidendes Element für die niedrigere NK-Rezeptor-Expression auf T-Zellen in der Darmmukosa hin. Die funktionellen Auswirkungen dieser gewebespezifischen NK-Rezeptor-Expression sind noch ungeklärt.

Die zweite in dieser Arbeit bearbeitete Fragestellung war die, ob nach einer Lm-Infektion die primäre Aktivierung naiver CD8 $^+$ T-Zellen und die Re-Aktivierung von Gedächtnis-T-Zellen auch außerhalb sekundärer lymphoider Organe stattfinden kann. Hierfür wurden Mäuse mit der immunmodulatorischen Substanz FTY720 behandelt, welche das Auswandern von T-Zellen aus Lymphknoten unterbindet. Zusätzlich wurde den Mäusen die Milz entfernt. So behandelte Tiere wurden mit LmOVA infiziert. Nachfolgend wurden die Bakterienzahlen

sowie die primären und sekundären T-Zell-Antworten in verschiedenen Organen untersucht. Durch eine FTY720-Behandlung wurde nach iv und nach ig Infektion weder die Ausbreitung der Lm in die Milz, die Leber und die MLN beeinträchtigt, noch die Fähigkeit der Mäuse zu einer Elimination der Bakterien aus diesen Organen vermindert. Orale Infektionen sowie höher dosierte iv Infektionen führten auch in FTY720-behandelten und zusätzlich splenektomierten Mäusen zu einer T-Zell-Akkumulation und Proliferation in nicht-lymphoiden Organen. Nach einer niedrig dosierten iv Lm-Infektion wurden dagegen in FTY720-behandelten und splenektomierten Mäusen keine OVA-spezifischen T-Zell-Antworten ausgelöst. Insbesondere die Milz schien hier für die T-Zell Aktivierung und Proliferation erforderlich zu sein. Auch für eine Sekundärantwort nach einer iv Infektion mit LmOVA waren lymphoide Gewebe für die Ausbildung einer effektiven T-Zell-Antwort essentiell. In Experimenten, in denen Gedächtnis-T-Zellen in splenektomierte Mäuse transferiert wurden, akkumulierten diese Zellen in der Leber, konnten aber nach einer Infektion der Mäuse mit LmOVA nicht proliferieren. Diese Beobachtung spricht für eine entscheidende Rolle der Milz bei der Expansion von Gedächtnis-T-Zellen nach einer sekundären iv Lm-Infektion. In welchem Maße sekundäre lymphoide Organe für die Ausbildung einer robusten LmOVA-spezifischen CD8⁺ T-Zell-Antwort erforderlich sind, hängt demnach von der Infektionsroute und -Dosis ab.

Schlagnworte: CD8 T-Zellen, intraepitheliale Lymphozyten, Darm, Aktivierung, Listerien

Summary

Conventional TZRαβ⁺ CD8αβ⁺ T cells in the intestinal epithelium differ in terms of phenotype and function from T cells with identical antigen specificity in other organs. Following iv infection with *Listeria monocytogenes* (Lm) high frequencies of Lm-specific T cells can be isolated from the intestinal mucosa, although after iv infection Lm only occasionally disseminates into this tissue. One aim of this study was, to characterise intestinal intraepithelial CD8⁺ T cells in more detail. Mechanisms, which determine gut-tropism of T cells or which influence the functional adaptation of these cells to the mucosal environment, should be identified. For this purpose, mice were infected with a recombinant Lm-strain (LmOVA) secreting a truncated ovalbumin protein. OVA-specific CD8⁺ T cells were isolated from spleen and intestinal epithelium and the mRNA-expression profiles of these cells were compared in a microarray-analysis. CD8⁺ T cells of the same antigen-specificity from spleen and small intestine had a clearly different mRNA-expression profile. One group of these

differentially expressed genes was coding for NK-receptors, which usually are expressed on NK cells and activated CD8⁺ T cells. These NK-receptors were substantially less expressed on Listeria-specific CD8⁺ T cells from the intestinal mucosa than on corresponding cells from the spleen. Flow-cytometric analysis revealed that this difference was much more pronounced following oral infection than following iv infection. The presence of the natural gut-flora only slightly influenced the organ-specific NK-receptor expression in CD8⁺ T cells. Experiments with transgenic CD4dnTGFβRII mice, which have a defective TGFβ-signaling, point to TGFβ as a decisive factor for the low NK-receptor expression on T cells from the gut mucosa. The functional consequences of this organ-specific NK-receptor expression pattern remain to be determined.

In the second part of this study it was investigated, whether, following Lm infection, priming of naive CD8⁺ T cells and re-activation of memory T cells could occur outside of secondary lymphoid organs. Mice were treated with the immunomodulatory drug FTY720, which inhibits lymphocyte egress from lymph nodes. Additionally, spleens of mice were surgically removed. Subsequently, mice were infected with LmOVA and bacterial titres as well as T cell responses were analysed in various organs. Treatment with FTY720 did neither diminish bacterial dissemination into spleen, liver and MLN, nor impair the ability of the mice to control the bacteria and to eradicate them from these organs. Oral infection and high dose iv infection led to T cell accumulation and proliferation in nonlymphoid organs of FTY720-treated and additionally splenectomized mice. Following low dose iv infection with LmOVA, no OVA-specific T cell responses were induced in FTY720-treated and additionally splenectomized mice. Especially the spleen seemed to be important for T cell activation and proliferation under these conditions. Also following a secondary iv infection with LmOVA, lymphoid tissues were essential for the generation of an effective T cell response. In experiments, in which memory T cells were transferred into splenectomized recipients, these cells accumulated in the liver, but did not proliferate following an infection of the mice with LmOVA. These results imply a decisive role of the spleen for the expansion of memory T cells following secondary iv LmOVA infection. To which extend secondary lymphoid tissues are required for the development of a robust LmOVA-specific CD8⁺ T cell response therefore depends on the route and dose of infection.

Keywords: CD8 T cells, intraepithelial lymphocytes, gut, priming, listeria

Inhaltsverzeichnis

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Zusammenfassung | I |
| Summary | II |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Das Immunsystem | 1 |
| 1.1.1 Das angeborene Immunsystem..... | 1 |
| 1.1.2 Das adaptive Immunsystem | 3 |
| 1.1.3 Lymphoide Organe..... | 5 |
| 1.1.4 Induktion primärer CD8 ⁺ T-Zell-Antworten..... | 7 |
| 1.1.5 Sekundäre CD8 ⁺ T-Zell-Antworten | 8 |
| 1.1.6 Priming außerhalb sekundärer lymphoider Organe | 9 |
| 1.1.7 FTY720 | 10 |
| 1.1.8 Das Immunsystem des Darmes | 11 |
| 1.1.9 Gewebespezifische Migration von CD8 ⁺ T-Zellen | 12 |
| 1.2 Das Listerien-Infektionsmodell..... | 13 |
| 2 Zielsetzung der Arbeit und Fragestellung..... | 15 |
| 3 Material und Methoden | 16 |
| 3.1 Mäuse..... | 16 |
| 3.2 Bakterien | 16 |
| 3.3 Bakterielle Infektion von Mäusen und Titerbestimmungen | 16 |
| 3.4 Splenektomie und FTY720 Behandlung | 17 |
| 3.5 Zellaufreinigung | 17 |
| 3.5.1 Erythrozyten-Lyse..... | 18 |
| 3.6 Antikörper und Fluorochrome | 18 |
| 3.7 Zellfärbung und durchflusszytometrische Analyse | 19 |
| 3.7.1 Extrazelluläre Färbung mit Antikörpern | 19 |
| 3.7.2 Tetramerfärbung..... | 20 |
| 3.7.3 <i>In vitro</i> Restimulation von Zellen und intrazelluläre Zytokinfärbung | 20 |
| 3.7.4 Durchflusszytometrische Analyse..... | 20 |
| 3.8 Herstellung von MHC-Klasse-I-Tetrameren..... | 21 |
| 3.9 Isolierung von Zellpopulationen durch magnetische und durchflusszytometrische Sortierung (MACS und FACS) | 21 |
| 3.10 Transferexperimente..... | 22 |
| 3.11 RNA-Isolierung aus Einzelzellsuspension | 22 |
| 3.12 Microarray-Analyse | 22 |
| 3.13 Statistische Analyse..... | 23 |
| 4 Ergebnisse | 24 |
| 4.1 Charakterisierung mukosaler CD8αβ ⁺ T-Lymphozyten nach bakterieller Infektion | 24 |
| 4.1.1 Transkriptomvergleich von antigenspezifischen CD8αβ ⁺ T-Zellen aus Milz, Leber und Dünndarmepithel nach Listerieninfektion..... | 24 |
| 4.1.2 NK-Rezeptoren auf CD8αβ ⁺ T-Zellen: gewebespezifische Expressionsmuster | 39 |
| 4.2 Analyse der Kapazität von Leber- und Darmgewebe zur Induktion primärer und sekundärer T-Zell-Antworten gegen <i>Listeria monocytogenes</i> | 50 |

| | | |
|----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.2.1 | Einfluss von FTY720 auf die Dissemination und Eradikation von Lm..... | 50 |
| 4.2.2 | Einfluss von FTY720-Behandlung und Splenektomie auf die primäre T-Zellantwort nach oraler Infektion | 51 |
| 4.2.3 | Einfluss von FTY720-Behandlung und Splenektomie auf die Primärantwort nach intravenöser Infektion | 55 |
| 4.2.4 | Einfluss einer FTY720-Behandlung und Splenektomie auf die Sekundärantwort nach iv Infektion | 60 |
| 5 | Diskussion..... | 66 |
| 5.1 | Charakterisierung mukosaler CD8$\alpha\beta$⁺ T-Lymphozyten nach bakterieller Infektion | 66 |
| 5.1.1 | Aussagekraft des Transkriptomvergleichs | 66 |
| 5.1.2 | Genexpressions-Unterschiede zwischen kürzlich aktivierten CD8 $\alpha\beta$ ⁺ T-Zellen aus Milz und Dünndarmepithel | 68 |
| 5.1.3 | NK-Rezeptor Expression auf aktivierten CD8 $\alpha\beta$ ⁺ T-Zellen..... | 70 |
| 5.2 | Untersuchung der Kapazität von Leber- und Darmgewebe zur Induktion primärer und sekundärer T-Zell-Antworten gegen <i>Listeria monocytogenes</i>..... | 77 |
| 5.2.1 | Auswirkung der FTY720-Behandlung auf die T-Zell-Populationen in verschiedenen Organen | 77 |
| 5.2.2 | Primäre T-Zell-Antwort in FTY720-behandelten und/oder splenektomierten Mäusen | 77 |
| 5.2.3 | Sekundäre T-Zell-Antworten in FTY720-behandelten und/oder splenektomierten Mäusen | 80 |
| Literatur | 82 | |
| Anhang | 99 | |
| Abkürzungsverzeichnis | 99 | |
| Danksagung | 101 | |
| Herstellerverzeichnis | 102 | |
| Publikationen | 104 | |
| Eidesstattliche Erklärung | 105 | |

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Unter dem Begriff Immunsystem sind eine Vielzahl von verschiedenen Zelltypen, Organstrukturen und löslichen Faktoren zusammengefasst, die im Zusammenspiel einen Organismus vor Schädigungen durch eindringende Fremdorganismen (Viren, Bakterien, Pilze, Parasiten) oder aber auch durch entartete körpereigene Zellen schützen. In der Regel können Pathogene oder mutierte Zellen durch eine geeignete Immunantwort eliminiert oder zumindest soweit kontrolliert werden, dass zu starke Schädigungen für den Körper vermieden werden. Die Aktivität der Immunzellen muss jedoch streng reguliert werden, um zu verhindern, dass gesunde körpereigene Zellen oder Strukturen angegriffen werden (Autoimmunreaktionen). Außerdem muss die Stärke einer Reaktion an die potentielle Gefährlichkeit eines Fremdorganismus angepasst werden und auch dessen Lokalisation im Körper berücksichtigen. Unkontrollierte Immunantworten können ansonsten die Funktion und Integrität wichtiger Organe zerstören oder wesentlich beeinträchtigen.

Wirbeltiere haben ein hoch entwickeltes und komplexes Immunsystem. Die Zellen des Immunsystems sind hoch spezialisierte Zellen, die je nach Zelltyp verschiedene Funktionen erfüllen. Das Immunsystem wird in zwei funktionelle Untereinheiten, das angeborene und das adaptive (erworbene) Immunsystem, eingeteilt. Die Antworten sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems werden in der Regel durch die Erkennung fremder „nicht-selbst“ Strukturen durch besondere Rezeptoren der Immunzellen initiiert. In bestimmten Fällen, wie z.B. bei mutierten Zellen kann aber auch die veränderte Expression körpereigener Moleküle eine Immunantwort auslösen. Meist wirken die Mechanismen und Komponenten des angeborenen und des adaptiven Systems bei einer Infektions-Bekämpfung synergistisch. Im Fokus dieser Arbeit stehen die CD8⁺ T-Zellen, die zum adaptiven Immunsystem gehören und infizierte oder transformierte körpereigene Zellen eliminieren. Wie später diskutiert, können diese Zellen aber unter Umständen auch Rezeptoren exprimieren und Antworten vermitteln, die eher dem angeborenen Immunsystem zuzuordnen sind.

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem erkennt typische konservierte Strukturen in von Pathogenen stammenden Molekülen. Die hier zugeordneten Immunantworten werden sofort nach einem Kontakt mit den entsprechenden Antigenen ausgelöst. Sie verändern sich bei einer wiederholten Infektion mit einem spezifischen Pathogen nicht. Die Erkennung von Zielmolekülen

bzw. Zielzellen erfolgt hier mit Hilfe von Keimbahn-kodierten Rezeptoren mit genetisch vorbestimmter Spezifität. Diese Rezeptoren, z.B. der Mannoserezeptor auf Makrophagen und die *toll-like* Rezeptoren (TLR) erkennen konservierte molekulare Strukturen, die auf vielen verschiedenen Mikroorganismen zu finden sind. Die wichtigsten Effektorzellen der angeborenen Immunantworten sind Monozyten/Makrophagen, Neutrophile, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Dendritische Zellen. Neben direkten Effektorfunktionen, haben diese Zellen eine wichtige Rolle bei der Antigenpräsentation und bei der Aktivierung und Differenzierung der Zellen des adaptiven Immunsystems. Nicht-zelluläre Komponenten des angeborenen Immunsystems sind die Komplement- und Akute-Phase-Proteine, sowie Zytokine und Chemokine.

Zytokine sind kleine Proteine, die gewöhnlich auf bestimmte Stimuli hin von verschiedenen Zellen im Körper sekretiert werden. Sie binden an spezielle Rezeptoren und können sowohl auf die ausschüttende Zelle selber (autokrin), auf umliegenden Zellen (parakrin) oder bei ausreichender Stabilität und Zugang zur Zirkulation auch auf entferntere Zellen (endokrin) wirken. Sie können in entscheidender Weise die Differenzierung, den Aktivierungsgrad und die Funktion von Zellen beeinflussen. Eine Untergruppe der Zytokine sind die Chemokine, welche in erster Linie chemotaktisch auf Immunzellen wirken.

Als erste Barriere gegen eindringende Mikroorganismen fungieren die den Körper umschließenden Epithelien. Neben der rein physikalischen Barriere sind hier je nach Lokalisation auch sekretierte Enzyme, antimikrobielle Peptide, ein niedriger pH-Wert oder auch konkurrierende, nicht-invasive, nicht-pathogene Bakterien für den Schutz gegen Pathogene verantwortlich. Insbesondere die mukosalen Flächen im Respirations-, Verdauungs- und Urogenitaltrakt lassen aber gelegentlich das Eindringen von Fremdorganismen zu. Sobald Mikroorganismen, wie z.B. Bakterien, in die Epithelschichten und in die darunterliegenden Gewebe des Körpers eindringen, werden sie in den meisten Fällen von dort residenten Makrophagen erkannt und phagozytiert. Makrophagen entwickeln sich aus Monozyten, die kontinuierlich aus dem Blut in nahezu alle Gewebe einwandern. Eine zweite Gruppe an Phagozyten sind die Neutrophilen, die sich überwiegend im Blut befinden. Während einer Infektion wandern die Neutrophilen aber sehr schnell und in großer Anzahl in das betroffene Gewebe ein und können nach Erkennung eines Pathogens dieses phagozytieren. In der Regel werden die Pathogene innerhalb der Phagozyten in sogenannten Phagolysosomen durch verschiedene toxische Substanzen getötet. Nach einer Aktivierung setzen die Makrophagen außerdem Zytokine, Chemokine und Lipidmediatoren frei, welche die Rekrutierung von Neutrophilen und Plasmaproteinen bewirken und darüber hinaus für die Induktion adaptiver Immunantworten wichtig sind. Ein für eine solche Induktion ebenfalls wichtiger Prozess ist,

dass die durch die Bindung von bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) ausgelöste TLR-Signalkaskade zur Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) auf Makrophagen und Dendritischen Zellen führt.

NK-Zellen können infizierte körpereigene Zellen und Tumorzellen direkt töten und produzieren Chemokine und inflammatorische Zytokine, wie Interferon- γ (IFN γ) und Tumornekrosis-Faktor (Trinchieri, 89). Sie werden durch von Makrophagen produzierte Zytokine, wie z.B. Interferone, aktiviert. NK-Zellen sind mit speziellen Keimbahn-kodierten Rezeptoren ausgestattet, die ihnen das Erkennen von Zielzellen erlauben. Eine einzelne NK-Zelle exprimiert verschiedene aktivierende und inhibierende NK-Rezeptoren (NKR), die je nach Liganden-Bindung in der Summe die Aktivität der Zelle bestimmen (Raulet *et al.*, 01). Es können drei Erkennungsmechanismen unterschieden werden: Die Erkennung von Pathogen-kodierten Molekülen, die Erkennung von selbst-Proteinen, deren Expression in infizierten, gestressten oder in Krebszellen heraufreguliert wird (*induced self recognition*), und die Erkennung von Proteinen, die auf der Oberfläche normaler Zellen vorhanden sind, in infizierten oder transformierten Zellen jedoch herunterreguliert werden (*missing self recognition*). Die Expression einiger dieser NK-Rezeptoren auf CD8⁺ T-Zellen, welche Effektoren adaptiver Immunantworten sind, wurde im Verlauf der hier dargestellten Arbeit Gegenstand der Untersuchungen und wird in Abschnitt 5.1.3 ausführlicher diskutiert.

Ein wichtiges Verbindungsglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität sind die Dendritischen Zellen (DC). Sie phagozytieren permanent lösliche Antigene. Nach Stimulation von TLR auf ihrer Oberfläche oder durch stimulierende Zytokine wie IFN γ werden sie aktiviert und differenzieren zu reifen Antigen-präsentierenden-Zellen (APZ). Diese tragen neben kostimulatorischen Molekülen auch Komplexe aus Haupthistokompatibilitätskomplex-Molekülen (MHC) und Peptiden fremder oder körpereigener Proteine auf ihrer Oberfläche. Der Kontakt dieser MHC-Peptid-Komplexe auf aktivierten DC mit naiven T-Zellen, die einen passenden T-Zell-Rezeptor (TZR) haben, führt zu einer Aktivierung dieser T-Zellen und der Initiation einer adaptiven Immunantwort.

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Obwohl das angeborene Immunsystem einen wesentlichen Beitrag zum Schutz vor Infektionen leistet, unterliegt es bestimmten Limitierungen. Die Diversität der Rezeptoren, welche pathogene Strukturen erkennen, ist begrenzt und die Spezifität der Rezeptoren kann nicht an sich schnell verändernde Organismen angepasst werden. Außerdem verfügt dieses System über kein „Gedächtnis“, d.h. es kann auf die wiederholte Infektion mit demselben Pathogen

nicht verbessert oder stärker reagieren. Viele Pathogene haben Mechanismen entwickelt, um die Erkennung durch das angeborene Immunsystem zu verhindern. Die T- und B-Lymphozyten des adaptiven Immunsystems haben keine genetisch vorbestimmten Rezeptoren und die TZR und B-Zell-Rezeptoren (BZR) sind hochspezifisch für ihr jeweiliges Antigen. Naive T- und B-Zellen verfügen alle über unterschiedliche Rezeptoren, wobei jede B- oder T-Zelle nur Rezeptoren einer einzigen Spezifität besitzt. Möglich wird dies durch einen Mechanismus der Genrekombination, bei dem die entsprechenden zu kombinierenden Segmente aus einer Vielzahl verschiedener Gensegmente zufällig ausgewählt werden. Auf diese Weise können mehr als 10^7 verschiedene TZR und BZR generiert werden. Diese enorme Anzahl an verschiedenen Rezeptoren erlaubt die Erkennung der meisten Pathogene. Sobald die T- oder B-Zellen in geeigneter Weise stimuliert werden, proliferieren sie und generieren große Mengen an Zellen, die das betreffende Antigen erkennen. Naive B-Zellen benötigen neben der Bindung des spezifischen Antigens an den BZR noch ein weiteres Signal, welches in der Regel von bestimmten aktivierten CD4-T-Zellen in einigen Fällen aber auch direkt von mikrobiellen Komponenten geliefert wird. T-Zellen werden durch die Präsentation des spezifischen Antigens durch eine aktivierte APZ stimuliert. Durch die somatische Genrekombination können auch Zellen entstehen, die körpereigene Strukturen erkennen. Um eine adaptive Immunreaktion gegen eigene Strukturen zu verhindern, findet ein Selektionsprozess statt, bei dem nahezu alle gegen selbst-Proteine gerichteten heranreifenden T- und B-Zellen deletiert werden.

Die Antigen-Erkennungs-Moleküle der B-Zellen sind Immunglobuline. Sie liegen einerseits als membranständige BZR vor, werden nach Aktivierung und Reifung der B-Zellen zu Plasmazellen aber auch als Antikörper (Ak) sekretiert. Ak können durch direkte Bindung an toxische Produkte, deren Wirkung neutralisieren, sie können Pathogene derart markieren, dass diese von Phagozyten erkannt und beseitigt werden (Opsonisierung), und sie können auch die Komplement-Kaskade auf einer Oberfläche auslösen.

T-Zellen erkennen nur Antigene, die auf der Oberfläche körpereigener Zellen präsentiert werden. Der TZR setzt sich aus zwei verschiedenen Polypeptidketten zusammen. Die große Mehrheit der TZR sind Heterodimere aus TZR α - und TZR β -Ketten. Einige T-Zellen besitzen jedoch stattdessen einen TZR aus $\gamma\delta$ -Heterodimeren und haben andere Eigenschaften als die konventionellen TZR $\alpha\beta$ -T-Zellen. Die von konventionellen T-Zellen erkannten Antigene werden von MHC-Molekülen auf der Oberfläche von körpereigenen Zellen präsentiert. Intrazelluläre Viren oder Bakterien aus dem Zytosol der körpereigenen Zellen werden durch MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert. Material, welches die Zellen aus dem extrazellulären

Milieu aufgenommen haben, wird durch MHC-Klasse-II-Moleküle präsentiert. Die überwiegende Zahl der T-Zellen lässt sich in zwei große Gruppen einteilen. Zytotoxische T-Zellen sind für die Elimination infizierter körpereigener Zellen zuständig. Infizierte Zellen präsentieren meist von den Pathogenen stammende Antigene in MHC-Klasse-I-Komplexen auf ihrer Oberfläche. Diese werden von den Zytotoxischen T-Zellen erkannt, welche daraufhin die infizierten Zellen töten können. Zytotoxische T-Zellen exprimieren ein CD8-Molekül, welches auf der Zelloberfläche mit dem TZR assoziiert. Es bindet an invariante Bereiche des Antigen-präsentierenden-MHC-Moleküls und fungiert als Korezeptor für den TZR. Das CD8-Molekül setzt sich aus zwei Polypeptidketten zusammen, wobei Heterodimere aus α - und β -Ketten üblich sind. Es gibt jedoch auch CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimere, die wiederum gesonderte T-Zell-Populationen kennzeichnen. Das von den CD8-T-Zell-TZR erkannte MHC-I-Molekül besteht aus einer α -Kette, innerhalb der sich eine Peptid-Bindungsgrube befindet, und dem β_2 -Mikroglobulin. Von diesem Komplex werden 8-10 Aminosäuren lange Peptide präsentiert.

Die zweite Gruppe von T-Zellen trägt ein CD4-Molekül auf der Oberfläche und erkennt Antigene, die von MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden. Nach Erkennung ihres Antigens auf aktivierten professionellen APZ differenzieren sie sich in zwei Untergruppen. Je nach Art der APZ, der Kostimulation und dem Zytokinmilieu entstehen T_{helfer}1- (Th1-) oder Th2-Zellen. Th1-Zellen produzieren die Zytokine Tumor-Nekrosis-Faktor- α (TNF α), Interleukin-2 (IL-2), IFN γ und Lymphotoxin (LT). Sie initiieren eine zellvermittelte Immunantwort durch die Verstärkung der antimikrobiellen Aktivität von Monozyten und Makrophagen, und sie unterstützen die Entwicklung Zytotoxischer-T-Zellen. Th2-Zellen sekretieren IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13, welche die Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen unterstützen. Außerdem fördern Th2-Zellen die Reifung und Aktivierung von Mast-Zellen und Eosinophilen, sowie die Produktion einer bestimmten Ak-Klasse (IgE). Diese Zellen und Ak sind besonders in die Abwehr von Parasiten involviert.

1.1.3 Lymphoide Organe

Wesentliche Elemente, die die Entwicklung einer adaptiven Immunantwort ermöglichen, sind die lymphoiden Organe. Die primären lymphoiden Organe sind das Knochenmark und der Thymus. Aus dem Knochenmark stammen die Vorläuferzellen der T- und B-Zellen. Die Vorläuferzellen der T-Zellen wandern aus dem Knochenmark in den Thymus, wo die somatische Genrekombination der TZR-Gene, die Deletion potentiell autoreaktiver T-Zell-Klone und die positiv-Selektion von T-Zellen, die in geeigneter Weise Peptid-MHC-Komplexe erkennen können, stattfinden.

Sekundäre lymphoide Organe ermöglichen die antigenabhängige Aktivierung und Differenzierung von T- und B-Lymphozyten. Da die Frequenz naiver T- und B-Zellen einer bestimmten Antigenpezifität sehr gering ist, sind die sekundären Lymphoiden Organe darauf spezialisiert, diese Zellen mit Antigenen und APZ aus dem gesamten Körper zusammenzubringen. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit, der Erkennung eines Antigens durch für dieses Antigen spezifische T- oder B-Zellen immens erhöht. Zu den sekundären lymphoiden Organen zählen die Lymphknoten, die Milz und das Mukosa-assoziierte-lymphoide-Gewebe (MALT). Letzteres schließt die Tonsillen, das nasal-assoziierte-lymphoide-Gewebe, das Bronchus-assoziierte-lymphoide-Gewebe und das Darm-assoziierte-lymphoide-Gewebe mit den Peyer-Plaques ein.

Lymphknoten enthalten distinkte T- und B-Zell-Kompartimente. Sie verfügen außerdem über zwei besondere Gefäßsysteme, die Lymphgefäße und spezialisierte postkapilläre Venolen mit einem hohen Endothel (*high endothelial venuels*, HEV). In dem lymphatischen System wird die extrazelluläre Flüssigkeit aus den Geweben gesammelt. Afferente lymphatische Gefäße leiten diese Flüssigkeit, die gegebenenfalls Antigen-beladene Zellen aus infizierten Geweben enthält, in die Lymphknoten. Naive T-Zellen und bestimmte Teilpopulationen von Gedächtnis-T-Zellen gelangen aus dem Blut über die HEV in die Lymphknoten. In diesen Prozess involviert ist die Interaktion zwischen L-Selektin (CD62L) auf der T-Zelloberfläche und bestimmten Zuckerstrukturen, den *peripheral-node addressins* (PNADs), auf den HEV peripherer Lymphknoten. Die Chemokine CCL21 und CCL19 sind ebenfalls an dem Eintritt von T-Zellen in Lymphknoten beteiligt. CCL21 wird von den HEV produziert, CCL19 von Stromazellen in der Umgebung der HEV. Beide Chemokine binden an den Chemokinrezeptor (CCR) CCR7, der auf naiven T-Zellen und Teilpopulationen von Gedächtnis-T-Zellen exprimiert wird. Interaktionen zwischen CCL21/CCL19 und CCR7 verstärken die T-Zell-Adhäsion an die HEV und ermöglichen dadurch die Transmigration der T-Zellen in die Lymphknoten. Nach Erkennung ihres spezifischen Antigens proliferieren die T-Zellen in den Lymphknoten, bevor sie diese über die efferenten lymphatischen Gefäße wieder verlassen. Naive T-Zellen, die nicht auf ihr Antigen treffen, verlassen die Lymphknoten ebenfalls über diesen Weg. Über den *Ductus thoracicus* gelangen die T-Zellen schließlich wieder in das Blut. Aus diesem können aktivierte T-Zellen dann in infizierte Gewebe einwandern und dort ihre Effektorfunktionen ausüben (Springer, 94).

Die Milz unterscheidet sich sowohl in ihrem Aufbau als auch in ihrer Organogenese von den Lymphknoten. In der Milz wird das Blut filtriert. Das Kernstück der Milz ist ein verzweigtes System aus Arterien und kleineren Arteriolen, die in ein venöses sinusoidales System

münden. Die kleineren Arteriolen sind mit lymphoidem Gewebe umgeben, welches die weiße Pulpa der Milz bildet. Die Hauptmasse der Milz wird aus der roten Pulpa gebildet, in der ältere rote Blutkörperchen aus der Zirkulation entfernt werden. Das lymphoide Gewebe in der Milz ist ähnlich wie die Lymphknoten aufgebaut. Auch hier gibt es distinkte T- und B-Zell-Zonen. Zwischen roter und weißer Pulpa liegt die Marginalzone. In dieser befinden sich spezielle Makrophagen-Populationen, B-Zellen und DC. Um in die weiße Pulpa der Milz zu gelangen, müssen die Lymphozyten aus dem Blut meist zunächst die Marginalzone passieren. Wie die Lymphozyten genau in die lymphoiden Zonen gelangen ist noch unklar (Mebius und Kraal, 05). Ebenso ist nicht im Detail bekannt, wie die Lymphozyten die weiße Pulpa wieder verlassen. Vermutlich passieren sie wiederum die Marginalzone, eventuell durch spezielle Kanäle zwischen weißer und roter Pulpa (Mebius und Kraal, 05).

Die Peyer-Plaques befinden sich in der intestinalen Mukosa und können über spezialisierte M-Zellen direkt Antigene aus dem Darmlumen aufnehmen. Neben diesen klassischen lymphoiden Organen können in Folge von Infektionen auch tertiäre lymphoide Gewebe entstehen (Drayton *et al.*, 06; Aloisi und Pujol-Borrell, 06; Eberl, 05).

Für die Entstehung von Lymphknoten sind Interaktionen zwischen LT- β -Rezeptor (LT β R)-exprimierenden Organisationszellen und LT $\alpha_1\beta_2$ -exprimierenden Induktorzellen erforderlich (Cupedo und Mebius, 05). Die Milz kann sich auch in Abwesenheit einer LT β R-Stimulation entwickeln, allerdings ist ihre innere Organisation dann gestört (Futterer *et al.*, 98).

1.1.4 Induktion primärer CD8⁺ T-Zell-Antworten

Die Aktivierung und klonale Expansion naiver T-Zellen wird oft als Priming bezeichnet und ist von der unmittelbaren Antwort bereits aktivierter T-Zellen gegenüber ihren Zielzellen zu unterscheiden. Ein initialer Kontakt zwischen T-Zellen und APZ wird durch die Interaktion verschiedener Adhäsionsmoleküle vermittelt. Zum Beispiel bindet das *leukocyte functional antigen-1* (LFA-1) auf der T-Zelloberfläche an *intercellular adhesion molecules* (ICAM) ICAM-1 oder ICAM-2 auf den APZ. Während dieser transienten Interaktion kommen die TZR der T-Zelle mit den MHC-Peptid-Komplexen auf der APC in Kontakt. Wird ein spezifischer MHC-Peptid-Komplex erkannt, so wird durch ein TZR-Signal eine Konformationsänderung in dem LFA-1-Molekül ausgelöst, die zu einer wesentlich stabileren Zell-Zell-Interaktion führt. Neben der Erkennung von MHC-Peptid-Komplexen durch den TZR bedarf es für die Aktivierung naiver T-Zellen eines gleichzeitig und von derselben Zelle übermittelten kostimulatorischen Signals. Dieses kann nur durch professionelle APZ wie DC, Makrophagen oder B-Zellen geschehen, wobei die DC hier am effektivsten sind. Die

strukturell verwandten Glykoproteine B7.1 und B7.2 sind auf aktivierten APZ befindliche Homodimere, die den CD28-Rezeptor auf T-Zellen stimulieren. In den allermeisten Fällen ist eine Stimulation von CD28 erforderlich, um die klonale Expansion naiver T-Zellen auszulösen. Nach einer Aktivierung exprimieren T-Zellen zusätzlich das CD40-Ligand-Protein (CD154). Dieses bindet an CD40 auf den APZ. Durch diese Interaktion erhält einerseits die T-Zelle zusätzliche aktivierende Signale, andererseits wird die APZ zur Expression weiterer B7-Moleküle angeregt. Eine ähnliche bidirektionale Stimulation wird durch das T-Zell-Molekül 4-1BB (CD137) und seinen Liganden 4-1BBL auf den APZ vermittelt. CD4⁺ T-Zellen, die Antigene auf derselben APZ erkennen wie die CD8⁺ T-Zelle, können durch die Aktivierung der APZ und die nachfolgend verstärkte Kostimulation ein Priming der CD8⁺ T-Zelle durch andernfalls zu schwach kostimulatorische APZ ermöglichen. In diesem Fall müssen also drei Zellen miteinander interagieren, um eine primäre CD8⁺ T-Zell-Antwort auszulösen.

1.1.5 Sekundäre CD8⁺ T-Zell-Antworten

Primäre Immunantworten gegen einen bestimmten Erreger bzw. ein bestimmtes Antigen führen zu der Ausbildung von Gedächtnis-T-Zellen, die bei einer erneuten Infektion mit demselben Agens zu einer schnelleren und stärkeren adaptiven Immunantwort führen.

Ein entscheidender Faktor für die beschleunigte Kinetik einer Sekundärantwort ist die erhöhte Frequenz der gegen ein bestimmtes Antigen reagierender Zellen. Gedächtnis-T-Zellen haben jedoch auch generell veränderte Eigenschaften gegenüber naiven T-Zellen, die ihnen eine raschere und stärkere Aktivierung erlauben. So werden z.B. nach einer initialen Aktivierung präferentiell T-Zell-Klone vermehrt und nach Abklingen der Primärinfektion als Gedächtnis-Zellen erhalten, deren TZR eine höhere Affinität für das Antigen haben (Busch *et al.*, 98; Savage *et al.*, 99). Außerdem weisen Gedächtnis-T-Zellen eine konstitutive Phosphorylierung und/oder Expression von Signalmolekülen des TZR-Signalwegs auf (Bachmann *et al.*, 99; Chandok und Farber, 04). Auch Gene, deren Proteinprodukte für die Einleitung einer Zellteilung notwendig sind, sind in CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen stärker exprimiert (Latner *et al.*, 04; Veiga-Fernandes und Rocha, 04). Alle diese Modifikationen könnten den Schwellenwert für die Stärke der Aktivierungssignale, welche für die Initiation einer Sekundärantwort erforderlich sind, herabsetzen. Tatsächlich wurde beschrieben, dass Gedächtnis-T-Zellen für ihre Aktivierung 10- bis 50-fach geringere Antigenkonzentrationen benötigen als naive T-Zellen (Pihlgren *et al.*, 96; Kimachi *et al.*, 03). Darüber hinaus sind Gedächtnis-T-Zellen weniger auf eine Kostimulation über B7/CD28 und CD40/CD40L angewiesen (Marzo *et al.*, 04; Bertram *et al.*, 04; Bachmann *et al.*, 04). Dafür könnten für eine Re-Aktivierung

dieser Zellen kostimulatorische Moleküle wie z.B. CD137, deren Expression durch eine primäre Aktivierung initiiert wurde, eine Rolle spielen (London *et al.*, 00; Bertram *et al.*, 04). Gedächtnis-T-Zellen können in der Peripherie auch nach Kontakt mit Antigenen, welche von nicht-professionellen Antigen-präsentierenden Zellen präsentiert werden, eine Antwort generieren. Es können verschiedene Untergruppen von Gedächtnis-T-Zellen definiert werden (Sallusto *et al.*, 99), für die eventuell unterschiedliche Aktivierungssignale erforderlich sind. Zentrale-Gedächtnis-T-Zellen exprimieren die Oberflächenmoleküle CCR7 und CD62L, die eine Migration in lymphoide Gewebe bewirken. Diese Zellen zeigen nur verzögerte Effektor-Antworten, sind aber zu einer anhalten Proliferation in der Lage. Effektor-Gedächtnis-T-Zellen sind dagegen gewöhnlich negativ für CCR7 und CD62L. Sie zeigen nach Antigenkontakt schnelle Effektor-Antworten, aber nur eine geringe Proliferation (Wherry *et al.*, 03; Roberts *et al.*, 05; Bachmann *et al.*, 05; Huster *et al.*, 06; Masopust *et al.*, 01b). Interessanterweise ist die Aktivierung von CD8⁺ Zentralen-Gedächtnis-T-Zellen in großem Maße von aus dem Knochenmark stammenden Zellen, insbesondere dendritischen Zellen, abhängig (Zammit *et al.*, 05; Belz *et al.*, 06). Daher scheinen Zentrale-Gedächtnis-T-Zellen komplexere Anforderungen für eine Aktivierung aufzuweisen, die eher denen naiver Zellen als denen von Effektor-T-Zellen ähneln.

1.1.6 Priming außerhalb sekundärer lymphoider Organe

Nach gängiger Auffassung werden naive T-Zellen nur in sekundären lymphoiden Organen aktiviert. Neuere Beobachtungen lassen allerdings den Schluss zu, dass ein T-Zell-Priming auch außerhalb sekundärer lymphoider Organe stattfinden kann (Feurerer *et al.*, 03; Klein und Crispe, 06; Wuensch *et al.*, 06; Lund *et al.*, 02; Moyron-Quiroz *et al.*, 04). In einigen dieser Studien werden T-Zellen in tertiären lymphoiden Strukturen, die in Folge einer Infektion entstehen, primär aktiviert (Moyron-Quiroz *et al.*, 04). Darüber hinaus gibt es auch Hinweise auf ein T-Zell-Priming außerhalb sekundärer oder induzierter lymphoider Strukturen. Diese Ergebnisse entstammen überwiegend Studien, in denen Mäuse verwendet wurden, die aufgrund einer fehlenden LTβR-Signaltransduktion diese Organe und Strukturen nicht ausbilden (Chin *et al.*, 01; Zhou *et al.*, 03; Wilhelm *et al.*, 02; Suresh *et al.*, 02; Yu *et al.*, 03; Gajewska *et al.*, 01; Kumaraguru *et al.*, 01; Lund *et al.*, 02).

Konträr zu diesen Arbeiten wird in LTβR^{-/-} Mäusen, denen einige Wochen vor Infektion mit dem Bakterium *Listeria monocytogenes* (Lm) die Milz operativ entfernt wurde, keine Induktion von T-Zell-Antworten beobachtet. Eine Splenektomie infizierter LTβR^{-/-} Mäuse verhindert außerdem weitestgehend die Entwicklung einer Sekundärantwort nach Re-

Infektion (Kursar und Jänner Manuskript eingereicht). In diesen Tieren findet keine Induktion von T-Zell-Antworten im Knochenmark oder im Lebergewebe statt, welche in anderen experimentellen Systemen gezeigt werden konnte. Laouar *et al.* haben außerdem gezeigt, dass in der intestinalen Mukosa von $LT\alpha^{-/-}$ Mäusen keine Induktion von T-Zell-Antworten gegen Lm stattfindet (Laouar *et al.*, 05).

1.1.7 FTY720

In der vorliegenden Arbeit wurde das T-Zell-Priming außerhalb sekundärer lymphoider Organe unter Einsatz der synthetische Substanz FTY720 (2-amino-2-[2-(4-octyl-phenyl)ethyl]propan-1,3-diol Hydrochlorid) untersucht. FTY720 hat eine hohe strukturelle Homologie zu Sphingosin-1-Phosphat (S1P), einem Lysophospholipid, das in hohen nanomolaren Konzentrationen im Serum zu finden ist (Kimura *et al.*, 01). S1P bindet an fünf verschiedene Oberflächenrezeptoren (S1P₁₋₅), von denen S1P₁ der dominierende Rezeptor auf Lymphozyten ist (Hla *et al.*, 01). Naive T-Zellen exprimieren S1P₁ und emigrieren aufgrund eines S1P Gradienten aus dem Thymus und den Lymphknoten (Matloubian *et al.*, 04; Cyster, 05). Nach einer T-Zell-Aktivierung im lymphoiden Gewebe wird S1P₁ vorübergehend herunterreguliert. Das erlaubt ein Verbleiben der Zellen in diesem Gewebe und verbessert so die Aktivierungseffizienz. Nach 2-3 Tagen, in denen die Zellen proliferieren, wird S1P₁ wieder in vorheriger Stärke exprimiert und die aktivierten T-Zellen können die Lymphknoten verlassen (Cyster, 05).

FTY720-P, das in vivo rasch durch Phosphorylierung aus FTY720 entsteht, ist ein Agonist für S1P₁, S1P₃, S1P₄ und S1P₅ (Brinkmann *et al.*, 02). Eine FTY720-Behandlung führt zu einer andauernden Herabregulation des S1P₁ und damit zu einer Akkumulation naiver und gegebenenfalls gerade dort aktivierter T-Zellen in sekundären lymphoiden Organen und im Thymus. Obwohl FTY720 eine primäre T-Zell-Aktivierung zulässt, verhindert es die Migration aktivierter T-Zellen aus den Lymphknoten in periphere Gewebe und verhindert bzw. vermindert dadurch periphere T-Zell-Antworten (Brinkmann *et al.*, 04; Cyster, 05; Morris *et al.*, 05; Pinschewer *et al.*, 00; Xie *et al.*, 03; Habicht *et al.*, 06). Die Milz nimmt in diesem Zusammenhang eine Sonderstellung ein, da die Lymphozyten dieses Organ nicht über das lymphatische System verlassen und daher vornehmlich andere Mechanismen das Auswandern der Zellen aus der Milz bestimmen (Mebius und Kraal, 05). FTY720 hält T-Zellen daher nur unvollständig in der Milz zurück (Mandala *et al.*, 02).

Neben dem oben beschriebenen hat FTY720 noch eine Reihe anderer Wirkmechanismen. Es kann die Herzfrequenz reduzieren und die Barriere-Funktion des Endothels verstärken (Brinkmann *et al.*, 04). Kürzlich wurde außerdem berichtet, dass FTY720 den Eintritt von

Lymphozyten in Lymphknoten über die HEV in einer Integrin-abhängigen Weise fördert (Pabst *et al.*, 06).

1.1.8 Das Immunsystem des Darmes

Die Darmmukosa ist eine relativ dünne und durchlässige Oberfläche, die die Aufnahme von Nährstoffen in den Körper ermöglicht. Die Durchlässigkeit des Darmepithels ermöglicht aber auch ein relativ leichtes Eindringen von Pathogenen in die Darmmukosa. Diese Pathogene müssen möglichst noch vor Ort bekämpft und an einer weiteren Verbreitung im Körper gehindert werden. Dafür ist ein spezielles Darm-assoziiertes lymphoides Gewebe (*gut associated lymphoid tissue*, GALT) zuständig. Hierzu gehören die Peyer-Plaques (PP) und kleinere lymphoide Strukturen in der Mukosa, wie die Cryptopatches und die isolierten lymphoiden Follikel. Daneben befinden sich aber auch Lymphozyten direkt zwischen den Epithelzellen (intraepitheliale Lymphozyten, IEL) und in der darunter befindlichen Lamina propria (Lamina propria Lymphozyten, LPL). Die mesenterischen Lymphknoten (MLN), welche den Darm drainieren, können ebenfalls zum GALT gezählt werden. Sie unterscheiden sich in einigen Aspekten von den peripheren Lymphknoten (PLN). Dazu gehören der Grad der Abhängigkeit von LT für die Organogenese (Mebius, 03), die Expression von *mucosal vascular addressin cell-adhesion molecule 1* (MAdCAM1) auf ihren HEV (von Andrian und Mempel, 03) sowie die Induktion darmspezifischer Migrationsmuster für in den MLN primär aktivierte T-Zellen (Johansson-Lindbom *et al.*, 03; Iwata *et al.*, 04). Die Immunzellen im GALT müssen nicht nur zwischen fremden und selbst-Antigenen unterscheiden sie dürfen auch gegen Nahrungsmittelantigene keine Immunantworten auslösen. Darüber hinaus tolerieren sie bis zu einem gewissen Grad auch Antigene von kommensalen Mikroorganismen im Darmlumen. Diese Bakterien sind vorteilhaft für den Wirt, da sie um die entsprechenden Nischen mit pathogenen Organismen konkurrieren. Außerdem tragen sie zum Nahrungsaufschluss und zur Vitaminsynthese bei. Die Immunzellen des Darmes unterliegen daher einer besonderen Regulation ihrer Aktivität.

Die Lymphozyten in den PP und den MLN stimmen in ihren Eigenschaften in vielerlei Hinsicht mit denen in PLN überein. In den IEL und LPL finden sich aber besondere nicht-konventionelle T-Zell-Subpopulationen. Auch die konventionellen T-Zellen in der Darmmukosa unterscheiden sich hinsichtlich der Funktionalität und des Phänotyps von äquivalenten Zellen in anderen Organen. In Säugetieren sind fast alle IEL T-Zellen. Nahezu alle IEL und ein Großteil der LPL weisen mit einer niedrigen CD62L-Expression einen für aktivierte T-Zellen charakteristischen Phänotyp auf. Nur ein Teil der T-Lymphozyten in den

IEL und LPL haben einen konventionellen $\alpha\beta$ TZR und konventionelle Korezeptoren wie CD4 oder CD8 $\alpha\beta$, und können klassische T-Zell-Antworten generieren. Die übrigen T-Zellen haben einen $\gamma\delta$ TZR und/oder exprimieren entweder keinen Korezeptor oder nur CD8 $\alpha\alpha$ Homodimere. Diese nicht-konventionellen T-Zellen erkennen keine klassischen MHC-Peptid-Liganden, sondern eine Reihe anderer Liganden, darunter MHC-Klasse-Ib-Moleküle. Der Großteil der IEL im Dünndarm sind CD8⁺ T-Zellen, von denen in der Maus ca. die Hälfte zu den konventionellen TZR $\alpha\beta$ ⁺ CD8 $\alpha\beta$ ⁺ Zellen gehört. Diese klassischen zytotoxischen T-Zellen aus den IEL sollen im Rahmen dieser Arbeit auf Unterschiede gegenüber phänotypisch ähnlichen Zellen in anderen Organen wie Milz und Leber untersucht werden. Eine Reihe von distinkten Eigenschaften ist bereits für die konventionellen T-Zellen aus den IEL beschrieben. Im Vergleich zu Gedächtnis-T-Zellen aus der Milz sind die intestinalen T-Zellen schneller aktivierbar und können so unmittelbar zytolytisch oder durch Zytokinsekretion auf eine lokale Re-Infektion reagieren (Masopust *et al.*, 01b; Masopust *et al.*, 01a). Für Gedächtnis-T-Zellen in den IEL ist beschrieben, dass sie im Gegensatz zu Milz-Gedächtnis-T-Zellen konstitutiv Granzym-B, eine wichtige Komponente für zytolytische Effektorfunktionen, exprimieren (Masopust *et al.*, 06). Bekannt ist weiterhin eine charakteristische Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinrezeptoren auf Teilpopulationen der IEL, auf die im folgenden Abschnitt näher eingegangen wird.

1.1.9 Gewebespezifische Migration von CD8⁺ T-Zellen

Um das Einwandern von Immunzellen aus dem Blut in das Gewebe zu ermöglichen, ist eine Interaktion dieser Zellen mit dem die Blutgefäße umschließenden Endothel erforderlich. Diese Interaktionen finden über spezielle Adhäsionsmoleküle statt. Selektine sind Membranglykoproteine, die konstitutiv oder nach Aktivierung von den Endothelzellen exprimiert werden. Sie binden an fukosylierte Oligosaccharid-Liganden auf vorbeifließenden Immunzellen und bremsen die Zellen ab. Der nächste Schritt einer stärkeren Bindung der Zellen an das Endothel wird durch auf den Immunzellen exprimierte Integrine wie z.B. LFA-1 vermittelt, die an Liganden, wie die ICAM-Proteine, auf dem Endothel binden. Chemokine können eine Konformationsänderung der Integrine hervorrufen, welche deren Affinität zu den entsprechenden Liganden erhöht. Anschließend können die Immunzellen zwischen den Endothelzellen hindurch und nachfolgend durch die subepitheliale Basalmembran hindurch in das Gewebe gelangen.

Untergruppen der aktivierten T-Zellen haben einen speziellen Tropismus für bestimmte Gewebe, der durch eine Kombination verschiedener Adhäsionsmoleküle bestimmt wird

(Springer, 94; Butcher und Picker, 96). Aktivierte Lymphozyten, die in den Darm wandern, exprimieren größere Mengen an $\alpha 4\beta 7$ -Integrin, dessen Ligand MAdCAM-1 in postkapillaren Venen der PP, der MLN und der Lamina propria des Darmes exprimiert ist. Chemokine sind in die gerichtete Migration von T-Zellen in den Darm wahrscheinlich ebenfalls involviert. So wird das Chemokin CCL25 (TECK) von Epithelzellen des Dünndarmes produziert und der Chemokinrezeptor CCR9 wird präferentiell auf IEL und LPL des Dünndarmes detektiert (Papadakis *et al.*, 00).

1.2 Das Listerien-Infektionsmodell

Lm ist ein Gram-positives, fakultativ intrazelluläres Bakterium, welches in den verschiedensten Umgebungen wie dem Erdboden, Wasser und diversen Nahrungsmitteln zu finden ist. Die Aufnahme des Bakteriums durch kontaminierte Lebensmittel kann in immungeschwächten Personen, Schwangeren und Neugeborenen ernsthafte Erkrankungen wie Meningitis und Sepsis mit einer hohen Todesrate verursachen. In den übrigen Personenkreisen wird Lm in der Regel durch das Immunsystem effektiv bekämpft und eliminiert.

Die experimentelle Lm-Infektionen von Mäusen ist ein gut charakterisiertes Modell, um die Immunantwort von Säugetieren zu untersuchen (Kaufmann, 03; Pamer, 04). Die natürliche Infektionsroute ist die orale Aufnahme der Bakterien. Lm infizieren intestinale Epithelzellen, überwinden die Epithelschicht und gelangen über die MLN sowie über das Blut in tiefere Organe wie die Milz und die Leber, wo sie Makrophagen und Hepatozyten infizieren. Nach dem Eindringen in eine Zelle kann Lm durch die Sekretion von Listeriolysin-O (LLO), welches die Phagosomenmembran zerstört, aus dem Phagosom entkommen. Diese direkte Invasion des Zytoplasmas stimuliert inflammatorische Antworten des angeborenen Immunsystems, ist aber auch Grundlage für einen effektiven Langzeitschutz durch das adaptive Immunsystem. Die zytosolische Lokalisation des Pathogens ermöglicht die Präsentation bakterieller Komponenten durch MHC-Klasse-I-Moleküle und damit die Induktion von $CD8^+$ T-Zell-Antworten. Studien in Mäusen, die kein funktionelles adaptives Immunsystem besitzen, haben gezeigt, dass das angeborene Immunsystem in der frühen Phase einer Lm-Infektion sehr effektiv ist, für eine vollständige Beseitigung der Erreger aber nicht ausreicht (Nickol und Bonventre, 77; Bancroft *et al.*, 91). Die Eradikation von Lm erfolgt T-Zell-vermittelt (McGregor *et al.*, 70). Eine Infektion von Mäusen mit Lm induziert starke $CD4^+$ and $CD8^+$ T-Zell-Antworten und beide Populationen sind in die Kontrolle der Infektion involviert. Gedächtnis-T-Zellen, insbesondere $CD8^+$ Gedächtnis-T-Zellen, die während einer

primären Infektion generiert wurden, sind entscheidend für einen Schutz gegen eine Re-Infektion (Ladel *et al.*, 94; Kaufmann, 03). Acht bis 10 Tage nach einer Infektion können hohe Frequenzen an Lm-spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der Milz und Leber, aber auch in weiteren Geweben wie der Lunge, der Niere und der intestinalen Mukosa gemessen werden. Ein ähnliches Verbreitungsmuster besteht auch für Lm-spezifische Gedächtnis-T-Zellen nach Elimination des Erregers (Kursar *et al.*, 02; Kursar *et al.*, 04; Huleatt *et al.*, 01; Pope *et al.*, 01).

Die Verteilung der Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen korreliert nur in begrenztem Maße mit der vorherigen Verteilung der Bakterien. Nach intravenöser (iv) Infektion, bei der die Lm nur sporadisch in andere Gewebe als in die Milz und die Leber gelangen, werden trotzdem hohe Frequenzen Lm-spezifischer T-Zellen in verschiedenen peripheren Geweben, insbesondere in der intestinalen Mukosa gemessen (Huleatt *et al.*, 01; Pope *et al.*, 01; Kursar *et al.*, 02; Kursar *et al.*, 04). Diese Verteilung von Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen spiegelt daher nur teilweise die Akkumulation von T-Zellen am Ort der Infektion wieder. Sie weist vielmehr auf ein intrinsisches Programm hin, welches die Migration aktivierter T-Zellen in periphere Gewebe, insbesondere in die intestinale Mukosa bestimmt.

2 Zielsetzung der Arbeit und Fragestellung

Das Immunsystem der Vertebraten ist hoch kompartmentalisiert und spezialisiert. Es verfügt einerseits über spezielle lymphoide Gewebe, ist andererseits aber auch in fast allen nicht-lymphoiden Organen und Geweben aktiv. Die Zellen des Immunsystems führen mitunter in verschiedenen Geweben unterschiedliche Funktionen aus und zeigen eine organspezifische Aktivierung und Regulation. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Aspekte einer solchen organspezifischen Aktivierung und Regulation von $CD8^+$ T-Zellen in einem Lm-Infektionsmodell untersucht.

Zum einen sollten Faktoren identifiziert werden, welche in die darmspezifische Migration, Retention und Funktion konventioneller $CD8^+$ T-Zellen involviert sind. Hierfür wurden nach einer Lm-Infektion $CD8^+$ T-Zellen aus Milz, Leber und intestinalem Epithel isoliert. Zellen gleicher Antigenspezifität wurden durchflusszytometrisch sortiert und einem Transkriptomvergleich unterworfen. Einige Gene mit einer unterschiedlichen Expression in T-Zellen aus Milz und Dünndarmepithel sollten ausgewählt und näher untersucht werden. Im Rahmen dieser Analysen wurde die Expression einer Gruppe von NKR in $CD8^+$ T-Zellen aus der Milz und dem Dünndarmepithel in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren, wie der Infektionsroute, der Darmflora und dem Zytokinmilieu charakterisiert.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Rolle von nicht-lymphoiden Organen für die primäre und sekundäre Aktivierung von T-Zellen im Verlauf von Lm-Infektionen. Vorhergehende Arbeiten auf diesem Gebiet lieferten z. T. widersprüchliche Ergebnisse. Ein großer Teil dieser Studien wurde mit Mäusen durchgeführt, die aufgrund einer gestörten LT-Signaltransduktion keine Lymphknoten besitzen. Da LT aber auch über die Organogenese von lymphoidem Gewebe hinaus in die T-Zell-Aktivierung involviert sein kann, sollte ein alternatives Modell verwendet werden. In dem hier beschriebenen Ansatz wurden Mäuse vor und während einer Lm-Infektion mit der immunmodulierenden Substanz FTY720, welche das Auswandern von Lymphozyten aus den Lymphknoten inhibiert, behandelt und zusätzlich splenektomiert. In so behandelten Tieren wurde die T-Zell-Antwort in verschiedenen Organen nach primärer und sekundärer Lm-Infektion untersucht.

3 Material und Methoden

Adressen und Kontaktinformationen der Hersteller sind im Anhang (Abschnitt 8.3) zu finden. Standard Laborchemikalien zum Ansetzen von Puffern und Lösungen wurden von Sigma, Merck oder Roth in *per analysis* Qualität erworben. Lösungen wurden in H₂O, welches mit einem Millipore Wasseraufbereiter deionisiert wurde, angesetzt. Lösungen wurden durch Autoklavieren für 25 min bei 121 °C oder mittels Filtration durch eine 0,2 µm Membran sterilisiert.

3.1 Mäuse

Balb/c Mäuse, OT1 Mäuse (Hogquist *et al.*, 94), Lymphotoxin-β-Rezeptor-defiziente (LTβR^{-/-}) Mäuse (Futterer *et al.*, 98), die auf den C57BL/6 Hintergrund zurückgekreuzt waren, und CD4dnTGFβRII transgene Mäuse (Gorelik und Flavell, 00) wurden in den Einrichtungen des Max-Planck-Institutes für Infektionsbiologie gezüchtet. C57BL/6 Mäuse und Thy1.1-kongene C57BL/6 Mäuse (B6.PL-Thy1a/CyJ, Jackson) wurden von der Bundesbehörde für Risikoforschung (BfR) bezogen. Unter keimfreien Bedingungen gezüchtete C57BL/6 Mäuse wurden von den Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin erhalten.

Die Durchführung der Tierexperimente erfolgte in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz.

3.2 Bakterien

Es wurden der Bakterienstamm *Listeria monocytogenes* EGD sowie ein rekombinanter *L. monocytogenes* Stamm (Foulds *et al.*, 02), der eine verkürzte Form des Ovalbumin Proteins sekretiert, verwendet. Die Bakterien wurden über Nacht in Tryptic-Soy-Broth-Medium (TSB) angezogen, zweimal mit Phosphatpuffer (PBS) gewaschen, in 10 % Glyzerol resuspendiert und bei -80 °C gelagert. Die Bakterienkonzentration wurde durch Ausstreichen serieller Verdünnungen auf TSB-Agar-Platten bestimmt.

3.3 Bakterielle Infektion von Mäusen und Titerbestimmungen

Mäuse wurden mit Lm oder LmOVA infiziert. Für eine iv Infektion wurden die Bakterien in sterilem PBS verdünnt und in einem Volumen von 200 µl in die laterale Schwanzvene injiziert. Für intragastrische (ig) Infektionen wurden die Bakterien über Nacht in TSB angezogen und zweimal mit PBS gewaschen. Die Bakteriendichte wurde photometrisch anhand der Absorption bei 600 nm bestimmt. Hierfür wurde zugrunde gelegt, dass eine optische

Dichte von 1 einer Konzentration von 10^9 Bakterien/ml entspricht. Nach entsprechender Verdünnung in PBS wurden die Bakterien in einem Volumen von 200 μ l mittels einer Schlundsonde verabreicht. Die Dosis des Inoculums wurde jeweils durch Ausstreichen serieller Verdünnungen auf TSB-Agarplatten kontrolliert.

Um den Listerien-Gehalt von Organen zu bestimmen, wurden die Mäuse getötet, die Organe in PBS homogenisiert, und serielle Verdünnungen der Homogenate wurden auf PALCAM-Listerien-Selektivagar mit Selektionsantibiotika (Merck) ausgestrichen. Nach 48 h Inkubation bei 30 °C wurden die Kolonien gezählt.

3.4 Splenektomie und FTY720 Behandlung

Vor der Splenektomie wurden die Mäuse durch die intraperitoneale Gabe von Ketamin (Ketavet, Pfizer) (80 mg/kg) und Xylazin (Rompun, Bayer) (16 mg/kg Körpergewicht) betäubt. Anschließend wurden die Milzen nach möglichst kleinen Schnitten in Haut und Bauchdecke durch Kauterisieren mit einem erhitzten Metallspatel steril entfernt. Die Wunden wurden mit einer Metallklammer verschlossen und die Tiere bis zum Erwachen warm gehalten. Die Mäuse wurden anschließend eine Woche lang mit 2 mg/ml Ampicillin im Trinkwasser behandelt. Vor einer Infektion konnten sich die Tiere mindestens drei Wochen von dem Eingriff erholen.

FTY720 (von Dr. Volker Brinkmann, Novartis, zur Verfügung gestellt) wurde in einer Konzentration von 5 μ g/ml dem Trinkwasser zugegeben. Soweit nicht anders angegeben, wurde mit der Behandlung einen Tag vor Infektion der Mäuse begonnen und die Anwendung bis zum Analysezeitpunkt fortgeführt. Das Trinkwasser mit dem FTY720 wurde alle drei Tage gewechselt.

3.5 Zellaufreinigung

Die Mäuse wurden durch Genickbruch getötet und die entsprechenden Organe entnommen.

Die Milz wurde durch Passieren des Organs durch ein Metallsieb homogenisiert. Die roten Blutkörperchen wurden anschließend lysiert. Aus MLN und PLN wurde ebenfalls mittels eines Metallsiebes eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Zellen wurden anschließend mit PBS, 0,2% Rinderserumalbumin (BSA) gewaschen.

Die IEL aus dem Dünndarm wurden wie in der Literatur beschrieben isoliert (Rudolphi *et al.*, 96; Kursar *et al.*, 02). Die Peyer-Plaques wurden entfernt, der Dünndarm aufgeschnitten und zweimal in PBS gewaschen. Der Dünndarm wurde 20 min bei 37 °C in komplettem RPMI-Medium [RPMI 1640 (Gibco), 10 % Hitze-inaktiviertes fötales Kälberserum (Biochrom), 2 mM L-Glutamin (Biochrom), 1 mM Natriumpyruvat (Biochrom), 50 μ M Mercaptoethanol

(Gibco), je 10 U/ml Penicillin und Streptomycin (Biochrom), 10 mM HEPES (PAA Laboratories)] gerührt. Anschließend wurde der Darm zweimal mit PBS durch Schütteln für 30 sek gewaschen. Der Überstand wurde durch ein 70 µm Nylonsieb (BD Bioscience) filtriert und anschließend zentrifugiert. Die Zellen wurden resuspendiert und in einem 40 % / 70 % Percoll-Gradienten (Biochrom) für 30 min bei $600 \times g$ zentrifugiert. Zellen aus der Interphase des Gradienten wurden in kompletten RPMI Medium aufgenommen und gewaschen.

LPL aus dem Dünndarm wurden wie in der Literatur beschrieben isoliert (Rudolphi *et al.*, 96; Harriman *et al.*, 92; Kursar *et al.*, 02). Nach der IEL-Isolation wurde der Dünndarm in 5 mm große Stücke geschnitten und für 30 min bei 37 °C unter Rühren in komplettem RPMI-Medium mit 0,07 U/ml Kollagenase D (Roche) und 300 U/ml Kollagenase Typ VIII (Sigma) verdaut. Die Zellsuspension wurde durch ein 70 µm Nylonsieb filtriert und anschließend zentrifugiert. Die Zellen wurden resuspendiert und in einem 40 % / 70 % Percoll-Gradienten für 30 min bei $600 \times g$ und RT zentrifugiert. Zellen aus der Interphase des Gradienten wurden in komplettem RPMI-Medium aufgenommen und gewaschen.

Die Leber wurde vor Entnahme durch Injektion von PBS in die *vena hepatica* perfundiert. Anschließend wurde die Leber entnommen, durch ein Eisensieb gerieben und so homogenisiert. Die Zellsuspension wurde mit PBS gewaschen, für 1 min bei $50 \times g$ zentrifugiert und der Überstand gesammelt. Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt. Die Überstände wurden abzentrifugiert und mit den Zellen im Pellet wurde eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen über einem 40 % / 70 % Percoll-Gradienten weiter aufgereinigt.

Soweit nicht anders angezeigt, wurden die Zellen eiskühlt und bei 4 °C zentrifugiert. Nach der Aufreinigung wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt, wobei tote Zellen durch Trypanblau-Färbung identifiziert wurden.

3.5.1 Erythrozyten-Lyse

Nach Isolation der Zellen aus den entsprechenden Geweben, wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in Erythrozyten-Lysepuffer (150 mM Ammoniumchlorid, 10 mM Kaliumhydrogencarbonat, 100 nM Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz Dihydrat) resuspendiert. Nach 3 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit PBS, 0,2 % BSA gewaschen.

3.6 Antikörper und Fluorochrome

Für die Sortierung von Zellen und für die durchflusszytometrische Analyse wurden monoklonale Antikörper (mAk) verwendet (Tabelle 1). Die mit der Herkunftsangabe MPIIB

versehenen mAk wurden aus Hybridoma-Überständen über Protein G-Sepharose gereinigt. Die mAk wurden mit den Fluoreszenzfarbstoffen APC (Allophycocyanin), APC-Cy7, Cy5 (Indiodicarbocyanin), FITC (Fluoreszein-Isothiozyanat), PE (R-Phycoerythrin), PE-Cy7, und PerCP (Peridinin Chlorophyll Protein) konjugiert bzw. in konjugierter Form von dem entsprechenden Hersteller bezogen.

Tabelle 1: Monoklonale anti-Maus Antikörper.

| Spezifität | Klon | Herkunft |
|--------------------|----------|----------------|
| CD4 | YTS191.1 | MPIIB |
| | GK1.5 | BD Biosciences |
| CD8 α | YTS169 | MPIIB |
| | 53-6.7 | BD Biosciences |
| CD8 β | H35-17.2 | MPIIB |
| CD16/CD32 | 2.4G2 | MPIIB |
| CD45R (B220) | RA3-6B2 | MPIIB |
| CD62L | Mel-14 | MPIIB |
| | | eBioscience |
| CD90.1 (Thy1.1) | HIS51 | eBioscience |
| CD90.2 (Thy1.2) | 53-2.1 | BD Biosciences |
| CD94 | 18d3 | eBioscience |
| CD244.2 (2B4) | 2B4 | BD Biosciences |
| IFN- γ | XMG1.2 | MPIIB, Berlin |
| KLRG1 | 2F1 | BD Biosciences |
| MHC-II | TIB 120 | MPIIB |
| NK1.1 | PK136 | MPIIB |
| NKG2A/C/E | 20d5 | eBioscience |
| NKG2D | CX5 | eBioscience |
| TCR $\gamma\delta$ | GL3 | MPIIB |

Mit magnetischen Beads gekoppelte anti-CD8 α mAk und anti-FITC mAk wurden von Miltenyi erworben. Für eine direkte Fluoreszenzmarkierung von Zellen wurden CFSE (5-,6-Carboxyfluorescein-diacetat-succinimidylester) (Molecular Probes), PI (Propidiumjodid) (Sigma) und 7-AAD (7-Amino-Actinomycin D) (BD Bioscience) verwendet. Rattenserum zum Blockieren unspezifischer Bindungen wurde von der BfR bezogen.

3.7 Zellfärbung und durchflusszytometrische Analyse

3.7.1 Extrazelluläre Färbung mit Antikörpern

2×10^6 Zellen wurden für 5 min bei 4 °C mit Ratten IgG Ak und anti-CD16/CD32 mAk in PBS, 0,2 % BSA inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Ak für 15-20 min bei 4 °C inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen mit PBS,

0,2% BSA gewaschen und in PBS aufgenommen. Propidiumjodid oder 7-AAD wurden kurz vor einer durchflusszytometrischen Analyse zugegeben.

3.7.2 Tetramerfärbung

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden 2×10^6 Zellen für 15 min bei 4 °C mit Ratten IgG Ak, anti-CD16/CD32 mAk und Streptavidin (Jackson ImmunoResearch) in PBS, 0,2 % BSA inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PE-konjugierten MHC-Klasse-I-OVA₂₅₇₋₂₆₄-Tetrameren und verschiedenen Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten mAk für 60 min bei 4 °C inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen mit PBS, 0,2 % BSA gewaschen und in PBS aufgenommen. Propidiumjodid oder 7-AAD wurden kurz vor der durchflusszytometrischen Analyse zugegeben.

3.7.3 *In vitro* Restimulation von Zellen und intrazelluläre Zytokinfärbung

Die Zellen (1 bis 4×10^6) wurden in 1 ml kompletten RPMI 1640 Medium aufgenommen und für 5 h mit den Peptiden Listeriolysin-O Aminosäure 190-201 (LLO₁₉₀₋₂₀₁, NEKYAQAYPNVS) oder Ovalbumin₂₅₇₋₂₆₄ (OVA₂₅₇₋₂₆₄, SIINFEKL) je 10^{-6} M stimuliert (JPT). Für die letzten 4 h der Inkubation wurden 10 µg/ml Brefeldin A (Sigma) zugegeben. Nach der Stimulation wurden die Zellen gewaschen und für 10 min mit Ratten IgG Ak und anti-CD16/CD32 mAk inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu blockieren. Nachfolgend wurden die Zellen entweder mit PE-konjugiertem anti-CD4 mAk oder Cy5-konjugierten anti-CD8α mAk gefärbt. Nach 30 min Färbung auf Eis wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 20 min bei Raumtemperatur mit PBS, 4 % Paraformaldehyd fixiert. Die Zellen wurden mit PBS, 0,1 % BSA gewaschen, mit PBS, 0,1 % BSA, 0,5 % Saponin (Sigma) permeabilisiert und in diesem Puffer mit Ratten IgG Ak und anti-CD16/CD32 mAk inkubiert. Nach 5 min wurden FITC-konjugierte anti-IFN-γ mAk oder Isotyp-Kontroll-Ak zugegeben. Nach 20 weiteren Minuten bei RT wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit PBS, 1 % Paraformaldehyd fixiert.

3.7.4 Durchflusszytometrische Analyse

Die Zellen wurden mit einem FACS-Calibur oder FACS-Canto und entsprechend mit der Cell Quest 3.0 oder DIVA Software gemessen (alle BD Bioscience). Die Analyse der so erhobenen Daten erfolgte mit dem Programm FCS Express (De Novo Software).

3.8 Herstellung von MHC-Klasse-I-Tetrameren

H-2K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄-Tetramere wurden wie beschrieben (Busch *et al.*, 98; Altman J.D. und Davis M.M., 03) hergestellt. Modifizierte Versionen der cDNA des H-2K^b und des humanen β 2m wurden freundlicherweise von Dr. E. Pamer und Dr. D. Busch zur Verfügung gestellt. Humanes β 2m und die extrazelluläre Domäne des H2K^b, welche mit einem Peptid mit einer speziellen Biotinylierungsstelle fusioniert war, wurden als rekombinante Proteine in *E.coli* exprimiert. Die Proteine wurden aufgereinigt, in 8 M Urea gelöst und in einem Rückfaltungspuffer gegeben, welcher das OVA₂₅₇₋₂₆₄ Peptid (SIINFEKL) enthielt. Die dabei entstandenen löslichen monomeren MHC-Klasse-I-Komplexe wurden mittels Gelfiltration aufgereinigt und mit Hilfe der Biotin Protein Ligase BirA (Avidity) enzymatisch biotinyliert. Freies Biotin wurde durch Reinigung der Komplexe mittels Gelfiltration abgetrennt. Für die Herstellung tetramerer MHC-Peptid-Komplexe wurde PE-konjugiertes Streptavidin (Molecular Probes) in einem molaren Verhältnis von 1 : 4 zu den Monomeren gegeben. Die Tetramere wurden durch Gelfiltration aufgereinigt und bei 4 °C gelagert.

3.9 Isolierung von Zellpopulationen durch magnetische und durchflusszytometrische Sortierung (MACS und FACS)

Die Sortierung mit magnetischen Beads (MACS) (Miltenyi) wurde angewendet, um Zellpopulationen anzureichern. MACS wurde sowohl zur positiven Selektion als auch zur Depletion unerwünschter Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden entweder mit Beads selektiert, an die Ak gegen bestimmte Oberflächenmoleküle gekoppelt waren, oder die Zellen wurden mit Fluorochrom-gekoppelten Ak gefärbt und anschließend mit Beads selektiert, an die den Farbstoff bindende Ak gekoppelt waren. Die Zellen wurden gemäß den Herstellerangaben mit den Beads inkubiert und nachfolgend auf LS-Säulen (Miltenyi) geladen, die sich in einem Magnetblock befanden. An die Beads gebundene Zellen wurden auf der Säule zurückgehalten, während ungebundene Zellen von der Säule gewaschen wurden. Im Falle der Depletion enthielt der Durchlauf die Zielzellen und wurde weiterverwendet. Im Falle der positiven Selektion wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die magnetisch markierten Zellen eluiert.

Die durchflusszytometrische Sortierung (FACS) wurde in der Durchflusszytometrie-Serviceeinheit des MPI für Infektionsbiologie durchgeführt. Die Zellen wurden mit Ak und gegebenenfalls MHC-Klasse-I-Tetrameren gefärbt und anschließend mit einem FACS-DIVA-Sorter (BD Bioscience) sortiert. Zum Ausschluss toter Zellen wurde kurz vor der Sortierung DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid) zugegeben. Alle Schritte wurden auf

Eis durchgeführt und die sortierten Zellen in einem gekühlten Röhrchen mit 500 µl PBS, 0,1 % BSA aufgefangen.

3.10 Transferexperimente

Bei den Zelltransferexperimenten sollte bei der späteren Analyse zwischen Empfänger- und Donor-Zellen unterschieden werden. Daher wurden die zu transferierenden Zellen aus Mäusen isoliert, die sich im Thy1 Antigen von den Rezipienten-Tieren unterschieden, ansonsten aber genetisch identisch waren. Zunächst wurden die Lymphozyten aus den Spendertieren isoliert und gegebenenfalls noch bestimmte Zellpopulationen mittels magnetischer Zellsortierung angereichert. Zur Untersuchung der Zellproliferation wurden die Zellen vor dem Transfer fluoreszenzmarkiert. Hierfür wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, 4 min mit 2 µM Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE, Molecular Probes) inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen einmal mit PBS, 0,5 % BSA und zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in einem Volumen von maximal 300 µl in die laterale Schwanzvene der Empfängertiere injiziert.

3.11 RNA-Isolierung aus Einzelzellsuspension

Die gesamt-RNA aus CD8⁺ T-Zellen wurde mit der TRIzol[®]-Reagenz-RNA-Präparationsmethode (Invitrogen) isoliert. Nach der durchflusszytometrischen Sortierung wurden die Zellen in 500 µl TRIzol[®] resuspendiert und dann bei -80 °C eingefroren. Die Suspension wurde gemäß den Herstellerangaben aufgetaut und für die RNA-Isolierung weiterverarbeitet. In einem Experiment für die RNA-Isolierung wurde das *PicoPureTM RNA Isolation Kit* (Arcturus) verwendet, in einem anderen bei der TRIzol[®] Isolierung die Fällung der RNA durch Zugabe von Glykogen und Ammoniumacetat (beides von Ambion) gefördert. Die RNA Integrität und Menge wurde abschließend mit einem Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies) bestimmt.

3.12 Microarray-Analyse

Die Microarray-Experimente wurden als zweifarbige Hybridisierungen durchgeführt. Die gesamt-RNA aus Einzelzellsuspensionen wurde wie in Abschnitt 3.11 beschrieben extrahiert. Nachfolgend wurde die RNA mit dem Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit (Agilent Technologies) amplifiziert und fluoreszenzmarkiert. Pro Probe wurde für zwei unterschiedliche Farbmarkierungen je eine zwischen 120 ng und 410 ng liegende RNA-Menge eingesetzt. Hierbei wurde die gesamt-RNA zunächst mit einem oligo-dT-Primer, der die Sequenz des T7-Polymerase-Primers trug, und reverser Transkriptase in cDNA

umgeschrieben. Hierbei fand eine lineare Amplifikation statt. Anschließend wurde mit einer T7-RNA-Polymerase unter Einbau von entweder Cyanin 3-CTP oder Cyanin 5-CTP (NEB Life Science Products) die cDNA wieder in cRNA umgeschrieben, was wiederum eine lineare Amplifikation beinhaltet. Die markierte cRNA wurde über RNeasy Säulen (Qiagen) gereinigt und mit einem Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies) quantifiziert.

Die markierte cRNA aus Milzzellen wurden mit der aus Leber, IEL oder LPL stammenden cRNA, die mit der zweiten Farbe markiert war, gemischt, fragmentiert und mit einem Array hybridisiert. Hierfür verwendet wurden ein spezieller 8,4 K-Oligonukleotid-Array, der 8013 Gensequenzen abdeckt, die als immunologisch relevant vorhergesagt wurden, und ein 44 K-Oligonukleotid-Array, welcher nahezu das gesamte Mausgenom abdeckt (beide Agilent Technologies). Für den 8,4 K-Array wurden in verschiedenen Experimenten 2,5 µg oder 2 µg markierte RNA je Farbe eingesetzt. Für den 44 K-Array wurden 2 µg markierte RNA je Farbe eingesetzt. Um eventuelle Effekte der Farbstoffe wie z.B. unterschiedlich guten Einbau in die RNA zu kompensieren, und um die Analyse statistisch relevanter Daten zu gewährleisten, wurde ein Farbtasch durchgeführt. Die RNA-Proben wurden vice versa mit den zwei fluoreszierenden Farbstoffen markiert und es wurden zwei unabhängige Hybridisierungen der RNA desselben Ursprungs aber mit unterschiedlicher Markierung durchgeführt. Diese beiden Hybridisierungen sowie das nachfolgende Auslesen wurden jeweils parallel durchgeführt, um identische Versuchsbedingungen zu gewährleisten und damit die Vergleichbarkeit der durch den Farbtasch erhaltenen Datenpaare sicherzustellen. Das Auslesen der Microarrays wurde mit einer Auflösung von 5 µm mit einem DNA-Microarray-Laser-Scanner (Agilent Technologies) ausgeführt. Die Daten wurden mit dem Bildanalyse-Werkzeug von Agilent Technologies (*feature extraction* Version A.7.1.1 und A.7.5.1) unter Verwendung der Standardeinstellungen extrahiert. Die Datenanalyse wurde mittels der Rosetta-Resolver-Software (Rosetta Biosoftware) durchgeführt.

3.13 Statistische Analyse

Wenn nicht anders angezeigt, bestanden experimentelle Gruppen aus mindestens drei Mäusen pro Gruppe, wobei die Tiere individuell analysiert wurden. Für die statistische Analyse der Zellfrequenzen wurde der Student's T-Test angewendet. Bakterientiter wurden mit dem Mann-Whitney-Test verglichen. Unterschiede wurden als signifikant angesehen, wenn $P \leq 0,05$ war.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung mukosaler $CD8\alpha\beta^+$ T-Lymphozyten nach bakterieller Infektion

Der Darm beherbergt eine Vielzahl von kommensalen Mikroorganismen, die zum Nahrungsaufschluss beitragen. Die Darmmukosa toleriert bis zu einem gewissen Grad die äußerliche Besiedlung mit diesen Organismen. Sie verhindert in der Regel das Eindringen von Krankheitserregern in den Körper, lässt aber gleichzeitig die Aufnahme von Nährstoffen zu. Um alle diese Funktionen gewährleisten zu können, bedarf es einer besonderen Regulation und Zusammensetzung der Immunzellen in der Darmmukosa. Im folgenden Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurden $CD8\alpha\beta^+$ T-Zellen, welche Teil des adaptiven Immunsystems sind, auf Veränderungen ihrer Eigenschaften oder Komposition im Dünndarmepithel hin untersucht.

4.1.1 Transkriptomvergleich von antigenspezifischen $CD8\alpha\beta^+$ T-Zellen aus Milz, Leber und Dünndarmepithel nach Listerieninfektion

Um bislang unbekannte Faktoren, welche die differentielle Migration und Funktion von mukosalen $CD8\alpha\beta^+$ T-Zellen beeinflussen, zu identifizieren, wurde eine Mikroarray-Analyse durchgeführt. Hierfür wurden Mäuse intragastrisch mit Listerien infiziert und zum Zeitpunkt der maximalen Expansion antigenspezifischer T-Zellen, am Tag 9 nach Infektion, wurden $CD8^+$ T-Zellen gleichen Phänotyps aus Milz, Leber und Dünndarm isoliert. Pro Experiment wurden Lymphozyten aus den Organen von 6-8 Mäusen entnommen. Die Zellen gleicher Organe wurden für die weitere Aufreinigung vereinigt. Die Lymphozyten wurden entweder direkt, mittels Durchflusszytometrie sortiert oder zuvor durch MACS angereichert und danach durchflusszytometrisch sortiert.

Eine MACS-Auftrennung wurde vorgeschaltet, um die Zielpopulation soweit anzureichern, dass eine ausreichende Effizienz der durchflusszytometrischen Sortierung gewährleistet war, die Zeit der Sortierung insgesamt möglichst kurz war, und um die Reinheit der am Ende erhaltenen Zellpopulation zu erhöhen. Bei sehr geringen Mengen an Ausgangszellen oder genügend hohen Frequenzen der Zielzellen, wie z.B. in der Leber, wurde auf eine MACS-Vorsortierung verzichtet.

Für die Vorsortierung mit magnetischen Beads wurden zwei verschiedene Strategien angewandt. Zur positiven Selektion wurden an anti- $CD8\alpha$ -mAk gekoppelte magnetische Beads verwendet. Alternativ wurden in einer negativ-Selektion die $CD8\alpha^+$ T-Zellen durch

Depletion der übrigen Zellen angereichert. Hierfür wurden die Zellen mit an FITC-gebundenen anti-CD4-, anti-MHC-II-, anti-B220- und anti-CD62L-mAk gefärbt und nach zweimaligem Waschen mit an anti-FITC-mAk-gekoppelten magnetischen Beads inkubiert. Unerwünschte Zellen konnten so auf LS-Säulen zurückgehalten werden, während sich die aktivierten CD62L^{low} CD8⁺ T-Zellen im Durchlauf der Säulen anreicherten. Die negative Selektion sollte die Zellen möglichst unberührt lassen. In den späteren Experimenten wurde jedoch eine positive Selektion durchgeführt, um insbesondere in den IEL die Verunreinigung mit Epithelzellen zu minimieren.

Für die nachfolgende durchflusszytometrische Sortierung wurden die Zellen mit anti-CD8 α -mAk und, sofern noch nicht fürs MACS geschehen, mit Ak gegen den Aktivierungsmarker CD62L angefärbt. Um möglichst homogene Zellpopulationen zu isolieren, die während ein und derselben Infektion aktiviert wurden und die das gleiche Antigen erkennen, wurden die Zellen außerdem mit MHC-Klasse-I-Tetrameren angefärbt. Die verwendeten OVA₂₅₇₋₂₆₄-Tetramere färben T-Zell-Rezeptoren an, die ein immundominantes Epitop des Ovalbumin-Proteins erkennen. Für diese Versuche wurden C57BL/6 Mäuse mit LmOVA infiziert.

In einem initialen Versuch wurde auf die Eingrenzung auf Tetramer-spezifische Zellen verzichtet. Hier wurden Balb/c Mäuse mit Wildtyp-Listerien infiziert. Bei der durchflusszytometrischen Zellsortierung wurden CD8 α ⁺, CD8 β ⁺ und CD62L^{low} Zellen isoliert. Der anti-CD8 β -mAk konnte in den übrigen Experimenten nicht gleichzeitig mit den MHC-Klasse-I Tetrameren verwendet werden, da er mit der Tetramerfärbung interferierte und zu stark reduzierten Frequenzen Tetramer-positiver Zellen führte. Zum Ausschluss falschpositiver Zellen wurde in einem Experiment stattdessen mit einem anti-TZR $\gamma\delta$ Ak zusätzlich zur Tetramerfärbung gefärbt, um Verunreinigungen mit TZR $\gamma\delta$ ⁺ T-Zellen zu minimieren. Tote Zellen wurden durch Färbung mit DAPI ausgeschlossen.

Ein Überblick über die in den einzelnen Experimenten zur durchflusszytometrischen Zellsortierung verwendeten Oberflächenmarker, sowie die Anzahl der erhaltenen und weiterverwendeten aufgereinigten Zellen, ist in Tabelle 2 gegeben. Die Auswahl der Population, die durchflusszytometrisch sortiert wurde, ist exemplarisch in Abbildung 1 gezeigt.

Aufgrund der geringen Ausbeute der gewünschten Zellpopulationen wurde auf eine Reanalyse der sortierten Zellen verzichtet. Üblicherweise liegt die Reinheit der so sortierten Zellen aber bei über 90%, oft bis zu 98 %.

Tabelle 2: Isolierung antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen aus verschiedenen Geweben.

| Mausstamm Anzahl der Tiere | Organ | Vorsortierung mit magnetischen Beads | Marker für Zellisolierung | Anzahl der Zellen nach durchflusszytometrischer Sortierung [$\times 10^6$] | Array |
|----------------------------------|-------|-----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Balb/c 8 | Milz | negativ: anti-FITC-Beads | CD8 $\alpha\beta^+$ CD62L ^{low} | 1,3 | 1 [8,4 K] |
| | Leber | keine | | 0,7 | |
| | IEL | keine | | 4,6 | |
| | LPL | keine | | 0,6 | |
| C57BL/6 6 | Milz | negativ: anti-FITC-Beads | CD8 α^+ CD62L ^{low} OVA ₂₅₇₋₂₆₄ -Tetramer ⁺ | 1,8 | 2 [8,4 K] |
| | Leber | keine | | 0,5 | |
| | IEL | keine | | 0,6 | |
| C57BL/6 6 | Milz | positiv: anti-CD8-Beads | CD8 α^+ CD62L ^{low} OVA ₂₅₇₋₂₆₄ -Tetramer ⁺ TZR $\gamma\delta^-$ | 0,43 | 3 [8,4 K] |
| | IEL | | | 0,68 | |
| C57BL/6 8 | Milz | positiv: anti-CD8-Beads | CD8 α^+ CD62L ^{low} OVA ₂₅₇₋₂₆₄ -Tetramer ⁺ TZR $\gamma\delta^-$ | 0,29 | 4 [44 K] |
| | Leber | keine | | 0,48 | |
| | IEL | positiv: anti-CD8-Beads | | 0,21 | |

Die Lymphozyten des Dünndarmes können in LPL und IEL eingeteilt werden. Pro Maus konnten nur ca. 2×10^6 LPL isoliert werden. Außerdem war durch den zur Isolierung eingesetzten enzymatischen Verdau die Zellsuspension recht stark mit Zell- und Matrixfragmenten verunreinigt, was die Effizienz insbesondere der durchflusszytometrischen Sortierung verminderte. Daher konnten weder mit MACS Vorsortierung noch ohne ausreichend mit Tetrameren angefärbte, antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen für eine Transkriptomanalyse mittels durchflusszytometrischer Sortierung isoliert werden. Diese Zellpopulation wurde deshalb nur bei dem Vergleich der aktivierten CD8 $\alpha\beta^+$ T-Zellen untersucht.

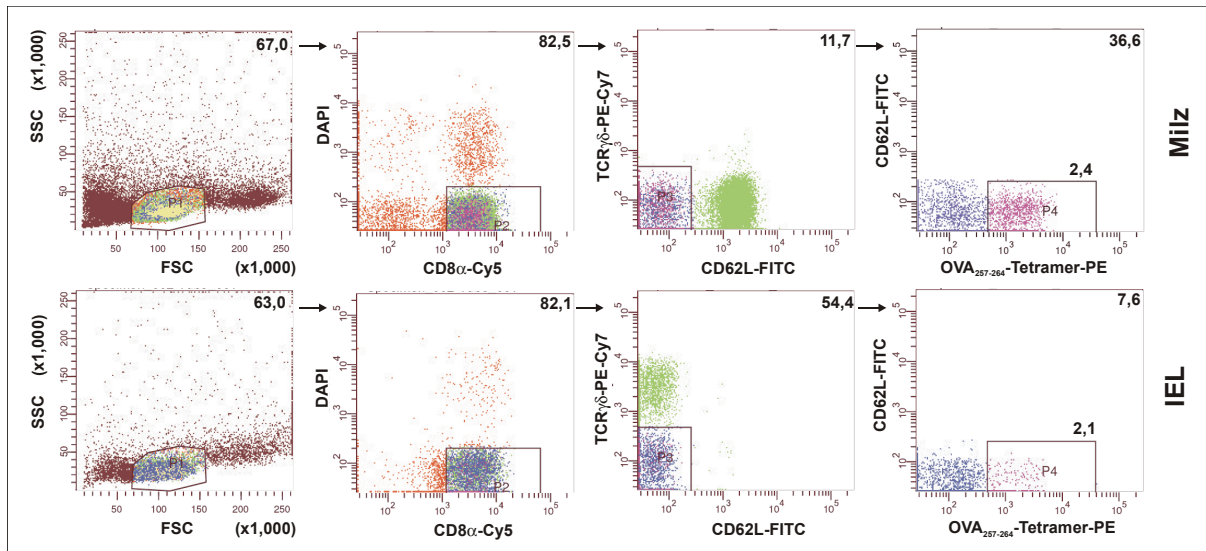


Abbildung 1: Durchflusszytometrische Sortierung antigenspezifischer $CD8^+$ T-Zellen. Am Beispiel der Milz- und IEL-Zellen, deren RNA für die Expressionsanalyse auf dem 44 K-Array verwendet wurde, ist die Auswahl der Populationen für die durchflusszytometrische Sortierung gezeigt. Ausgangsmaterial waren mit anti- $CD8$ -mAk-Beads magnetisch vorsortierte Zellen. Auf den Dot-Plots ist jeweils die im Plot zuvor eingegrenzte Population angezeigt. Die Zahlen in der rechten oberen Ecke geben den Prozentsatz der Zellen der neu eingegrenzten Population innerhalb der Elternpopulation an. Die Zahl direkt über Population vier (P4), der Zielpopulation, zeigt deren prozentualen Anteil an allen eingesetzten Zellen. SSC Seitwärtsstreulicht, FSC Vorwärtsstreulicht.

Nach der Sortierung wurden die Zellen abzentrifugiert und in TRIzol[®] aufgenommen, um eine Degradation der RNA zu verhindern. Die Proben wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und bis zur RNA-Isolierung gelagert. Die Gesamt-RNA wurde wie unter Punkt 4.8 beschrieben isoliert und die Menge, sowie die Qualität der RNA mittels eines Bioanalysers 2100 (Agilent Technologies) bestimmt. Die Konzentration der jeweils gewonnenen RNA lag zwischen $30\text{ ng}/\mu\text{l}$ und $640\text{ ng}/\mu\text{l}$. Die RNA wurde mit Cy5 oder Cy3 markiert und dabei linear amplifiziert. Hybridisiert wurde sie mit einem maßgefertigten 8,4 K-Oligonukleotid-Array, der 8013 Gensequenzen, die als immunologisch relevant vorhergesagt wurden, abdeckt oder mit einem 44 K-Oligonukleotid-Array, welcher das gesamte Mausgenom abdeckt (beide Agilent Technologies). Die RNA aus den Milz $CD8^+$ T-Zellen wurde hierbei jeweils mit der RNA aus $CD8^+$ T-Zellen, die aus einem anderen Gewebe isoliert wurden, gemeinsam hybridisiert. Als Ergebnis wurden die Unterschiede in der Genexpression von T-Zellen des entsprechenden Gewebes gegenüber jener in korrespondierenden Milzzellen erhalten. Jede dieser Kombination aus zwei RNA Proben wurde auf zwei Arrays hybridisiert, wobei die Farbmarkierung der RNA getauscht wurde, um Effekte der Farbmarkierung auszuschließen und Fehler zu minimieren. Beim Auslesen wurde die Farbe und Intensität der einzelnen Punkte auf dem Array gemessen. Analysiert wurden die Daten mit der Rosetta Inpharmics Resolver Software. Zunächst wurde das Verhältnis der normalisierten Signalintensitäten

beider Farben je Sequenz (ratio) auf dem einen Array mit der ratio auf dem zweiten Array mit gegensätzlicher Farbmarkierung der RNA verglichen (Abbildung 2A). Nur antikorrelierte Gene wurden als differentiell reguliert betrachtet und in die weitere Analyse einbezogen. Dies waren solche, die z.B. in der ersten Hybridisierung für Cy5 und in der zweiten Hybridisierung nach Farbtasch für Cy3 eine ähnliche Intensität zeigten. Als signifikant unterschiedlich wurden nur solche Sequenzen betrachtet, für die die Resolver Software in den beiden Hybridisierungen jeweils einen P-Wert $\leq 0,05$ berechnet hatte.

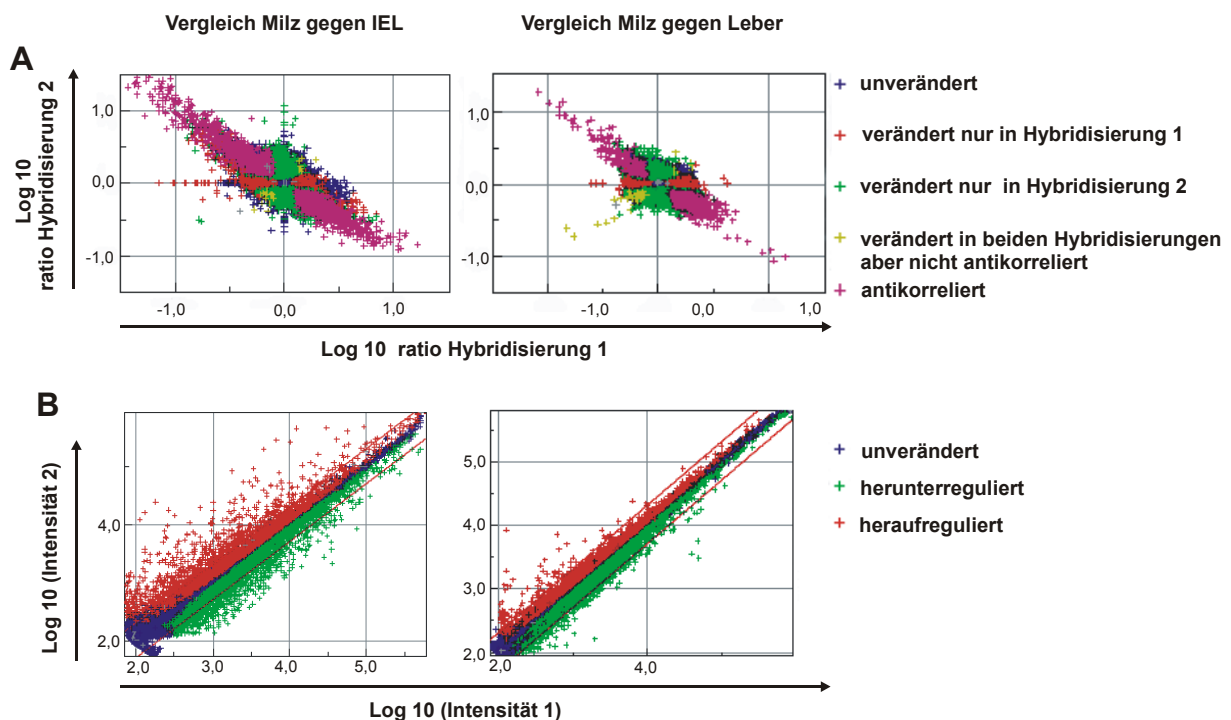


Abbildung 2: Korrelation der ratio Profile nach Farbtasch und Intensitätsplot nach Verrechnung der zwei unabhängigen Hybridisierungen gegensätzlich Cy5 und Cy3 markierter RNA. Gezeigt ist der Vergleich von antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen aus der Milz mit Zellen aus dem Dünndarmepithel (IEL) und der Vergleich dieser Zellen aus der Milz mit Zellen aus der Leber, hybridisiert auf einem 44 K-Maus-Array. (A) Vergleichsplots der log10 ratios für Sequenzen zweier Hybridisierungen nach Farbtasch. (B) Intensitätsplot der sich aus der Verrechnung beider Hybridisierungen ergebenden Intensitäten, angegeben als log10. Die außerhalb der roten Linien liegenden Datenpunkte sind mehr als 2-fach unterschiedlich.

Die in den beiden Hybridisierungen erhaltenen x-fachen Unterschiede und Intensitäts-Werte wurden zu je einem Wert verrechnet (Abbildung 2B). Bei der Berechnung dieser Werte wurden die Ausgangswerte nach ihrem jeweiligen Fehlerwert gewichtet. Werte, die in beiden Hybridisierungen einen P-Wert $\leq 0,05$ hatten, die antikorreliert waren und die nach Verrechnung der beiden Werte einen mindestens 2-fachen Unterschied aufwiesen, werden im Nachfolgenden als differentiell reguliert betrachtet und bezeichnet.

Tabelle 3 zeigt die Anzahl, der in den einzelnen Experimenten jeweils differentiell regulierten Gene und gibt an, wie viele von ihnen im Vergleich zur Expression in Milz CD8⁺ T-Zellen herauf oder herunter reguliert waren. Beim Vergleich von CD8αβ⁺ CD62L^{low} T-Zellen (Analyse 1) waren 615 Gene in den IEL anders als in entsprechenden Zellen aus der Milz reguliert. In den LPL wurden 525 unterschiedlich regulierte Gene bestimmt und in der Leber deutlich weniger, nämlich nur 160. Die differentiell exprimierten Gene waren ungefähr zu gleichen Teilen herauf oder herabreguliert. Zwischen den in IEL und LPL differentiell zu Milzzellen regulierten Genen gab es eine Überschneidung von 335 Genen (Abbildung 3A).

Die beiden Vergleiche antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen auf 8,4 K-Arrays (Analyse 2 und 3) ergaben für die IEL eine deutlich kleinere Anzahl unterschiedlich regulierter Gene, die aber zwischen den beiden Versuchen vergleichbar war (250 und 238, siehe Tabelle 3). Die Überschneidung zwischen diesen beiden Datensätzen betrug allerdings nur 133 Gene (Abbildung 3D). Für Zellen aus der Leber wurden in Analyse 2 nur 19 unterschiedlich regulierte Gene identifiziert. Diese Zahl ist im Vergleich zu den in Analyse 1 und 4 erhaltenen Anteilen unterproportional. Bei Analyse 3 war die Menge der isolierten RNA aus der Leberlymphozyten-Population nicht ausreichend für eine Transkriptomanalyse. Überlappungen der jeweils differentiell regulierten Gene zwischen den Proben aus verschiedenen Organen innerhalb eines Experimentes, sowie zwischen einzelnen Experimenten sind detaillierter in Abbildung 3 dargestellt.

Tabelle 3: Anzahl der unterschiedlich regulierten Gene.

| Analyse Array | Organ | ≥ 2 × | herauf | herunter |
|------------------|-------|-------|--------|----------|
| 1 [8,4 K] | IEL | 615 | 308 | 307 |
| | Leber | 160 | 89 | 71 |
| | LPL | 525 | 263 | 262 |
| 2 [8,4 K] | IEL | 250 | 163 | 87 |
| | Leber | 19 | 11 | 8 |
| 3 [8,4 K] | IEL | 238 | 118 | 120 |
| 4 [44 K] | IEL | 1233 | 668 | 565 |
| | Leber | 299 | 186 | 113 |

Gezeigt sind Gene, die in den angegebenen CD8⁺ T-Zell-Populationen aus IEL oder Leber eine mindestens 2-fach unterschiedliche Expression gegenüber den entsprechenden Milz-CD8⁺ T-Zellen hatten. Berücksichtigt sind nur Gene, die diesen Unterschied antikorreliert in 2 unabhängigen Hybridisierungen der Cy5- und Cy3-markierten RNA pro Versuch aufwiesen.

Um eine größere Sicherheit über reproduzierbar in den IEL differentiell zu Milz CD8⁺ T-Zellen regulierte Gene zu erlangen, wurde eine dritte Hybridisierung von RNA aus antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen durchgeführt. Diesmal wurde der mittlerweile verfügbare Gesamt-Mausgenom Array von *Agilent* verwendet, um so gleichzeitig Hinweise auf für die Modulierung der Zellen wichtige, auf dem 8,4 K-Array nicht erfasste Gene zu erlangen. Von den über 40.000 erfassten Sequenzen zeigten 1233 also ca. 3 % in den IEL einen mindestens 2-fachen Unterschied gegenüber Milz CD8⁺ T-Zellen. In der Leber waren dies nur 299 Sequenzen, von denen sich gut die Hälfte in der Liste, der in den IEL differentiell exprimierten Sequenzen wiederfand (Tabelle 3 und Abbildung 3E).

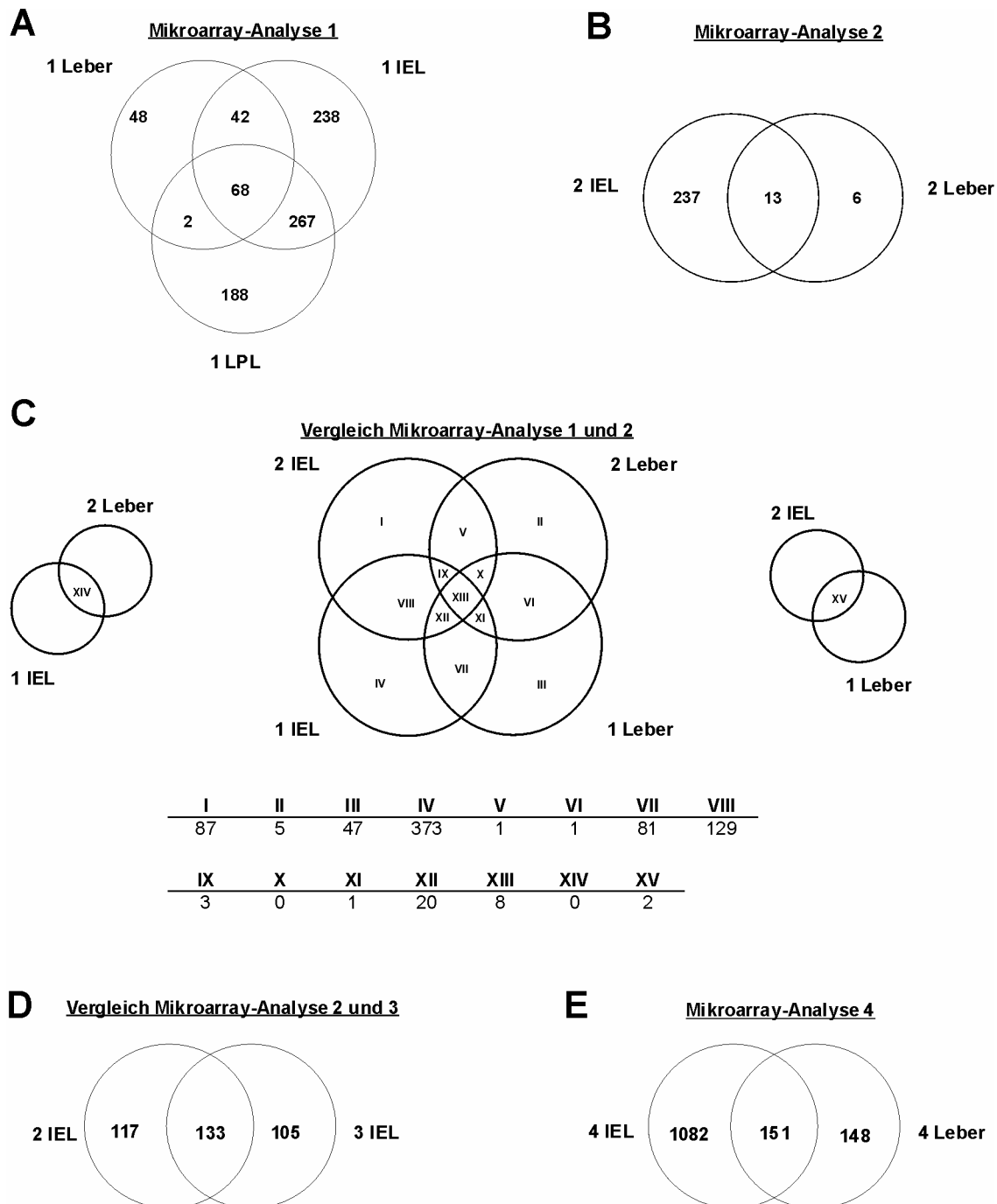


Abbildung 3: Venn-Diagramme der Mikroarray-Analyse von CD8⁺ T-Zellen aus Milz, Leber, IEL und LPL. Gezeigt sind Gene, die in den Zellen aus den entsprechenden Organen gegenüber Milzzellen derselben Präparation mindestens 2-fach unterschiedlich exprimiert waren. A, B und E zeigen die Anzahl der Gene, die in nur einem oder mehreren Organen einer Versuchsgruppe unterschiedlich gegenüber der Milz exprimiert waren. In C und D ist die Anzahl von Genen dargestellt, deren differentielle Expression gegenüber der Milz in den angezeigten Organen aus zwei unabhängigen Versuchen überlappte oder unterschiedlich war. Zur Übersicht über die Versuche 1-4 siehe Tabelle 2.

Um Gene zu identifizieren, die in den IEL reproduzierbar differentiell reguliert waren, wurden nur diejenigen Sequenzen betrachtet, die in allen vier Experimenten mindestens 2-fach unterschiedlich exprimiert waren. Zur weiteren Eingrenzung wurde für Analyse 3, für die zusammen mit Analyse 4 die größte Reinheit der sortierten Zellen angenommen wurde, ein

Schwellenwert von 3-fach unterschiedlicher Expression gesetzt. Dieser höhere Schwellenwert sollte die Wahrscheinlichkeit, dass der Unterschied auch mit alternativen Methoden wie z.B. FACS eindeutig nachweisbar ist, und dass er biologische relevant ist, erhöhen. Die resultierenden 31 Gene sind in Tabelle 4 aufgelistet. Zu erwähnen ist das Auftauchen des Genes T-Zell-Rezeptor Gamma Variable 4, und des Hitzeschock-Proteins Hspa1a in dieser Liste. Die stärkere Expression des Genes T-Zell-Rezeptor Gamma Variable 4 kann auf eine Verunreinigung der IEL Population mit TZR $\gamma\delta^+$ T-Zellen hindeuten. Die relative Fluoreszenzintensität für dieses Gen in den Milzproben lag bei einem Wert von 1000. Dieser Wert liegt deutlich über den Hintergrundwerten ($< 100-200$), sodass das Transkript auch tatsächlich aus CD8 $\alpha\beta^+$ T-Zellen stammen kann. Die starke Expression des Hitzeschock-Proteins Hspa1a kann durch während des Aufreinigungsprozess induzierten Stress bedingt sein. Möglich ist aber auch, dass das Darmmilieu, z.B. durch eine höhere Konzentration an toxischen Stoffen, wirklich eine stärkere Expression des Hspa1a in den IEL bewirkt. Das Integrin- αE war in allen vier Experimenten in den IEL deutlich heraufreguliert. Die Hochregulation von Integrin- αE , ist für intraepitheliale CD8 $^+$ T-Zellen im Dünndarm charakteristisch (Kilshaw und Murant, 90; Ericsson *et al.*, 04). Daher zeigt dieses Gen, dass mit der hier durchgeführten Analyse gewebespezifische Expressionsunterschiede in den T-Zellen aufzeigbar sind.

Sieben der Gene sind mit dem Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Signalweg (MAPK-Signalweg) assoziiert (annotiert über KEGG_PATHWAY mit DAVID (*Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery*)), darunter vier *dual specificity phosphatase* Gene. Fünf Gene konnten mit Chemotaxis assoziiert werden (*Gene Ontology Term* Biologisches Produkt, Ebene 4, DAVID). Dies waren der Chemokin-(C-motif)-Ligand 1 (Lymphotactin), die Chemokin-(C-C motif)-Liganden 3 und 4, (MIP-1 α und MIP-1 β), der Chemokinrezeptor 2 sowie Interferon- γ . Hormonelle Einflüsse wurden durch die verstärkte Expression des Prostaglandin-E-Rezeptors 4 (Subtyp EP4) sowie der beiden Gene *nuclear receptor subfamily 4 group A member 1* und 2 (NUR77 und NURR1), welche zur Familie der Steroid-Hormonrezeptoren gehören, sichtbar. Die beiden letzteren Gene kodieren Transkriptionsfaktoren, die voraussichtlich keine Hormone als direkte Liganden binden (Wang *et al.*, 03). Für NURR1 ist aber z.B. eine Induktion durch Prostaglandin E2 oder das *corticotropin-releasing-hormon* (CRH) (Holla *et al.*, 06; Murphy und Conneely, 97) beschrieben.

Des Weiteren kodieren zwei der Gene, nämlich der *natural killer cell receptor 2B4* (CD244) und der *killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1* (KLRG1), für NK-Zell-Rezeptoren.

Tabelle 4: In vier Experimenten in den IEL anders als in der Milz exprimierte Gene.

| x-facher Unterschied zur Milz | | | | | | | Accession number | Sequenzname | Gen |
|-------------------------------|------|------|-------|------|------|------|------------------------|----------------------|---------------------------------------------------------------|
| IEL | | | Leber | | | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 4 | | | |
| -11,7 | -4,9 | -6,1 | -6,5 | 1,0 | -1,1 | 1,1 | NM_010730 | Anxa1 | annexin A1 |
| 17,0 | 2,6 | 4,8 | 4,1 | 1,4 | -1,1 | 1,2 | AF184208 ^a | NK cell receptor 2B4 | CD244 natural killer cell receptor 2B4 |
| 2,9 | 5,1 | 7,0 | 16,9 | -1,2 | 1,6 | 1,2 | NM_008510 | Scyc1 | chemokine (C motif) ligand 1 |
| 9,7 | 3,6 | 5,1 | 10,8 | 2,4 | 1,8 | 1,7 | NM_011337 | Scya3 | chemokine (C-C motif) ligand 3 |
| 10,7 | 5,6 | 7,7 | 15,2 | 3,2 | 2,5 | 1,6 | NM_013652 | Scya4 | chemokine (C-C motif) ligand 4 |
| -8,2 | -3,3 | -4,2 | -3,6 | 1,5 | -1,4 | -1,2 | NM_009915 | Cmkbr2 | chemokine (C-C) receptor 2 |
| 12,5 | 4,7 | 7,2 | 7,3 | 3,9 | 1,6 | 1,5 | NM_009895 | Cish | cytokine inducible SH2-containing protein |
| 8,1 | 5,3 | 5,7 | 18,6 | 4,8 | 2,9 | 3,8 | NM_013642 | Ptpn16 | dual specificity phosphatase 1 |
| 2,1 | 2,8 | 4,3 | 5,1 | 2,0 | 1,7 | 1,7 | NM_010090 | Dusp2 | dual specificity phosphatase 2 |
| 5,0 | 3,4 | 8,1 | 10,6 | 2,0 | 1,4 | 2,5 | BE852540 ^b | BE852540 | dual specificity phosphatase 6 |
| 2,4 | 4,2 | 3,7 | 6,7 | -1,3 | 1,3 | 1,7 | AI158871 ^c | Dusp10 | dual specificity phosphatase 10 |
| 4,5 | 4,3 | 3,0 | 13,9 | 2,0 | 1,6 | 1,7 | NM_007913 | Egr1 | early growth response 1 |
| 29,0 | 6,6 | 11,5 | 14,5 | 1,7 | -1,3 | 1,2 | NM_018882 | Cyt28 | G protein-coupled receptor 56 |
| 5,0 | 4,7 | 4,0 | 5,8 | 2,2 | 1,2 | -1,0 | NM_008655 | Myd118 | growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta |
| 12,8 | 2,4 | 8,1 | 47,9 | -1,7 | 1,0 | -1,1 | NM_008399 | Itgae | integrin, alpha E, epithelial-associated |
| 7,2 | 4,7 | 4,7 | 7,2 | 7,7 | 3,5 | 2,5 | M28621 ^d | Ifng | interferon gamma |
| -6,7 | -3,1 | -5,9 | -4,2 | -1,0 | -1,4 | -1,3 | NM_010553 | Il18rap | interleukin 18 receptor accessory protein |
| 9,1 | 4,3 | 4,1 | 7,0 | 4,0 | 2,0 | 1,9 | NM_008416 | Junb | Jun-B oncogene |
| -11,6 | -4,0 | -5,1 | -3,1 | -1,1 | -1,4 | -1,1 | NM_016970 | Klrg1 | killer cell lectin-like receptor subfamily G, member 1 |
| -6,1 | -4,7 | -4,9 | -2,8 | 1,2 | -1,2 | -1,3 | NM_008495 | Lgals1 | lectin, galactose binding, soluble 1 |
| 36,3 | 3,9 | 5,4 | 5,8 | 2,2 | 1,2 | 1,1 | NM_019980 | LOC56722 | LPS-induced TN factor |
| -7,1 | -3,8 | -6,3 | -3,5 | 1,2 | 1,0 | -1,2 | NM_010741 | Ly6c | lymphocyte antigen 6 complex, locus C |
| -4,7 | -3,3 | -4,2 | -2,2 | 1,3 | 1,0 | -1,0 | AF231406 ^e | Ly6i | lymphocyte antigen 6 complex, locus I |
| 47,4 | 55,4 | 34,7 | 32,3 | 15,9 | 6,8 | 3,9 | M12571 ^f | Hspa1a | Mus musculus heat shock protein 1A (Hspa1a), mRNA [NM_010479] |
| 5,9 | 6,6 | 3,2 | 37,4 | 1,8 | 1,9 | 2,0 | NM_010444 | Nr4a1 | nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1 |
| 22,0 | 15,3 | 7,4 | 18,7 | 1,2 | 1,8 | 3,0 | NM_013613 | Nr4a2 | nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2 |
| 6,2 | 4,0 | 5,5 | 6,1 | 1,8 | 1,5 | 1,4 | NM_008965 | Ptgerep4 | prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4) |
| 15,6 | 17,0 | 14,6 | 23,0 | 4,0 | 4,4 | 2,5 | NM_009061 | Rgs2 | regulator of G-protein signaling 2 |
| 16,1 | 4,8 | 6,2 | 6,2 | 3,5 | -1,2 | 1,1 | NM_011558 ^g | Tcrg-V4 | T-cell receptor gamma, variable 4 |
| 5,2 | 3,2 | 3,8 | 3,8 | 1,9 | 1,3 | 1,1 | NM_010177 | Tnfsf6 | tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 6 |
| 8,8 | 3,4 | 5,2 | 24,5 | 2,7 | 1,9 | 2,2 | NM_009397 | Tnfaip3 | tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3 |

Gezeigt sind die Gene, deren Expressionslevel sich in vier unabhängigen Experimenten in den IEL mindestens 2-fach und in Experiment 3 mindestens 3-fach von dem in der Milz unterscheiden. Neben dem x-fachen Unterschied der Expression in den IEL gegenüber der Expression in der Milz ist auch der Expressionsunterschied zwischen den entsprechenden Leberlymphozyten und den Milzzellen zum Vergleich mit angegeben. Die Auflistung ist alphabetisch nach Gennamen sortiert. ■ MAPK-Signalweg-assoziert, ■ Chemotaxis-assoziert, ■ NK-Zell-Rezeptoren. Auf dem 44 K-Array von denen auf dem 8,4 K-Array abweichende *Accession numbers*: a) AK033178 b) NM_026268 c) NM_022019 d) NM_008337 e) NM_020498 f) NM_010479 g) K02899. Zur Übersicht über die Versuche 1-4 siehe Tabelle 2 und 3.

Nach der Entdeckung dieser zwei NKR Gene in der Liste der reproduzierbar differentiell regulierten Gene wurde in den Ausgangsdatensätzen der vier Experimente nach weiteren differentiell regulierten NKR gesucht (Tabelle 5). Diese Analyse ergab, dass sechs NKR in mindestens zwei von vier Experimenten herabreguliert waren (KLRG1, NKR-P1C, NKG2A, NKG2C, NKG2E und NKG2D). CD94, auf welches dies ebenfalls zutraf, ist kein eigenständiger Rezeptor, sondern bildet mit NKG2A, -C und -E Heterodimere. 2B4 war dagegen in 3 von 4 Experimenten heraufreguliert. In der Leber waren diese Rezeptoren in keinem Experiment signifikant unterschiedlich reguliert.

Tabelle 5: Unterschiedliche Expression von NKR in Milz und IEL CD8⁺ T-Zellen.

| x-facher Unterschied zur Milz | | | | | | | Accession number | Sequenzname | Gen | Alias |
|-------------------------------|------|------|-------|------|------|------|------------------------|-------------|---------------------------------------------------------|---------|
| IEL | | | Leber | | | | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 4 | | | | |
| 18,1 | 1,9 | 4,8 | 6,9 | 1,3 | 1,1 | 1,2 | NM_018729 | Nmrk | CD244 natural killer cell receptor 2B4 | 2B4 |
| -1,5 | -2,0 | -1,8 | -2,0 | -1,0 | -1,1 | 1,0 | NM_010654 | Klrd1 | killer cell lectin-like receptor, subfamily D, member 1 | CD94 |
| -11,6 | -4,0 | -5,1 | -3,1 | -1,1 | -1,4 | -1,1 | NM_016970 | Klrg1 | killer cell lectin-like receptor subfamily G, member 1 | KLRG1 |
| -2,6 | -2,3 | -3,4 | -2,7 | 1,1 | -1,1 | 1,1 | NM_010652 | Klrc1 | killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1 | NKG2A |
| -1,8 | -1,1 | -2,0 | -3,7 | 1,3 | -1,0 | -1,4 | NM_010653 ^a | Klrc2 | killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 2 | NKG2C |
| -3,5 | -1,8 | -6,2 | -6,8 | 1,3 | -1,2 | -1,3 | AF039026 ^b | D6H12S2489E | killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1 | NKG2D |
| -2,7 | -2,2 | -3,5 | -2,8 | 1,1 | -1,2 | -1,1 | NM_021378 | Nkg2e | natural killer cell group 2E cell receptor | NKG2E |
| -2,1 | -3,0 | -3,5 | -4,4 | 1,3 | -1,6 | -1,2 | NM_008527 | Klrb1c | killer cell lectin-like receptor subfamily B member 1C | NKR-P1C |

Gezeigt sind die Unterschiede der mRNA Level verschiedener NKR in aktivierten CD8⁺ T-Zellen aus dem intestinale Epithel und der Leber gegenüber solchen aus der Milz. Dargestellt sind die Ergebnisse von vier unabhängigen Experimenten. Die Tabelle ist alphabetisch nach dem Alias sortiert. *Accession numbers*, die auf dem 8,4 k Array von denen auf dem 44 K Array abweichen: a) AK036555 b) NM_033078. Unter Alias sind die Bezeichnungen der Gene, wie sie im Text dieser Arbeit verwendet werden, aufgeführt. Zur Übersicht über die Versuche 1-4 siehe Tabelle 2.

Ein Ziel dieser Arbeit war, über die bereits bekannten Faktoren hinaus, eine gewebetypische Regulation der Migration von T-Zellen zu finden. Daher war besonders die Expression von Chemokinrezeptoren in den IEL von Interesse. Aufgrund der beschriebenen Ergebnisse anderer Gruppen wurde angenommen, dass CCR9 in den IEL stärker exprimiert ist (Zabel *et al.*, 99; Svensson *et al.*, 02) und CCR7 schwächer (Sallusto *et al.*, 99; Shires *et al.*, 01). Nach den oben erläuterten und angelegten Auswahlkriterien erschien aber in den durchgeführten Versuchen nur CCR2 als signifikant differentiell reguliert (Tabelle 4). Für eine genauere

Analyse wurden die Expressionsunterschiede der Chemokinrezeptoren in den CD8⁺ T-Zellen aus den IEL gegenüber denen aus der Milz aus allen vier Experimenten zusammengestellt (Tabelle 6). Diese Daten lassen den Schluss zu, dass CCR9 tatsächlich in den Darmzellen stärker exprimiert ist, während für CCR7 bestenfalls eine sehr geringe Herabregulation zu sehen ist. Das Gen *chemokine (C-X3-C) receptor 1* (CX3CR1) war in drei von vier Experimenten in den IEL > 2-fach schwächer exprimiert und im vierten 1,9-fach. Für diesen Rezeptor, welcher das unter anderem von intestinalen Epithel- und Endothelzellen sezernierte Chemokin Fractalkine bindet, ist eine Expression auf Subpopulationen humaner IEL beschrieben (Muehlhoefer *et al.*, 00). Die Expression dieses Rezeptors ist aber auch für T-Lymphozyten-Populationen aus Blut, Milz und MLN beschrieben (Foussat *et al.*, 00; Harcourt *et al.*, 06).

Tabelle 6: Unterschiedliche Expression von Chemokinrezeptoren.

| x-facher Unterschied zur Milz IEL | | | | Accession number | Sequenzname | Gen |
|--------------------------------------|------|------|------|---------------------|-------------|---------------------------------------------------------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | | | |
| 1,3 | -1,3 | 1,0 | 1,0 | NM_009912 | Cmkbr1 | chemokine (C-C motif) receptor 1 |
| -1,0 | 1,0 | 1,0 | -1,3 | NM_007718 | Cmkbr11 | chemokine (C-C motif) receptor 1-like 1 |
| -8,3 | -3,3 | -4,2 | -3,6 | NM_009915 | Cmkbr2 | chemokine (C-C motif) receptor 2 |
| 1,8 | 1,1 | 1,2 | -1,0 | NM_009914 | Cmkbr112 | chemokine (C-C motif) receptor 3 |
| -1,2 | 1,1 | -1,2 | 1,4 | NM_009916 | Cmkbr4 | chemokine (C-C motif) receptor 4 |
| 1,4 | -1,0 | 1,3 | 1,9 | NM_009917 | Cmkbr5 | chemokine (C-C motif) receptor 5 |
| 1,0 | 1,9 | -1,2 | 1,2 | NM_009835 | Cmkbr6 | chemokine (C-C motif) receptor 6 |
| -5,1 | 1,0 | -1,7 | -1,4 | NM_007719 | Cmkbr7 | chemokine (C-C motif) receptor 7 |
| -1,2 | 1,5 | 1,4 | 1,0 | NM_007720 | Cmkbr8 | chemokine (C-C motif) receptor 8 |
| 3,5 | 1,5 | 4,6 | 14,0 | NM_009913 | Cmkbr10 | chemokine (C-C motif) receptor 9 |
| -1,4 | -1,2 | 1,6 | -1,3 | NM_007721 | Cmkbr9 | chemokine (C-C motif) receptor 10 |
| 2,8 | 1,6 | 1,2 | 2,1 | NM_017466 | L-CCR | chemokine (C-C motif) receptor-like 2 |
| -1,9 | 1,4 | 1,6 | -1,1 | NM_008153 | Cmk1r1 | chemokine-like receptor 1 |
| 1,3 | 1,5 | 1,3 | 1,0 | NM_007722 | Cmkor1 | chemokine orphan receptor 1 |
| -2,5 | -1,9 | -2,6 | -5,5 | NM_009987 | Cx3cr1 | chemokine (C-X3-C) receptor 1 |
| 1,4 | 1,2 | 1,3 | 1,2 | NM_009910 | Cmkar3 | chemokine (C-X-C motif) receptor 3 |
| -1,6 | -1,3 | -1,3 | 2,1 | NM_009911 | Cmkar4 | chemokine (C-X-C motif) receptor 4 |
| -1,6 | 1,3 | 1,6 | 1,2 | NM_009909 | Cmkar2 | interleukin 8 receptor, beta, chemokine (C-X-C) receptor 2 |
| 1,0 | 1,7 | 1,2 | 1,1 | NM_011798 | Ccxcr1 | chemokine (C motif) receptor 1 |
| / | / | / | 1,8 | NM_030712 | Cxcr6 | chemokine (C-X-C motif) receptor 6 |

Gezeigt sind die Unterschiede der mRNA Level verschiedener Chemokinrezeptoren in aktivierten CD8⁺ T-Zellen aus intestinale Epithel gegenüber solchen aus der Milz. Es sind die Daten für vier unabhängige Experimente dargestellt. Zur Übersicht über die Versuche 1-4 siehe Tabelle 2 und 3.

Da sich der 44 K-Array gegenüber dem 8,4 K-Array nicht auf eine Vorauswahl immunologisch als relevant vorhergesagter Gene beschränkt, sondern das gesamte Mausgenom abdeckt, wurde der mit diesem Chip erhaltene Datensatz auch separat analysiert. Dieses Experiment wurde nicht repliziert. Daher konnte die Analyse nur Trends aufzeigen und eventuell sehr stark unterschiedlich regulierte Gene identifizieren, für die eine Validierung des Expressionsunterschiedes sowie eine weitere Untersuchung interessant erscheint. Die 1233 in den IEL mindestens 2-fach anders als in den Milzzellen exprimierten Gene wurden mit DAVID funktionell annotiert und gruppiert. 1133 *Accession Numbers* wurden von DAVID erkannt und bearbeitet. Die Gene wurden mit dem *Gene Ontology Term* Biologisches Produkt (BP), Ebene 2 annotiert und mit dem Werkzeug *Functional Annotation Chart* unter Standardeinstellungen dargestellt (Abbildung 4). 529 der analysierten Gene wurden dabei keiner der gezeigten Gruppen zugeordnet.

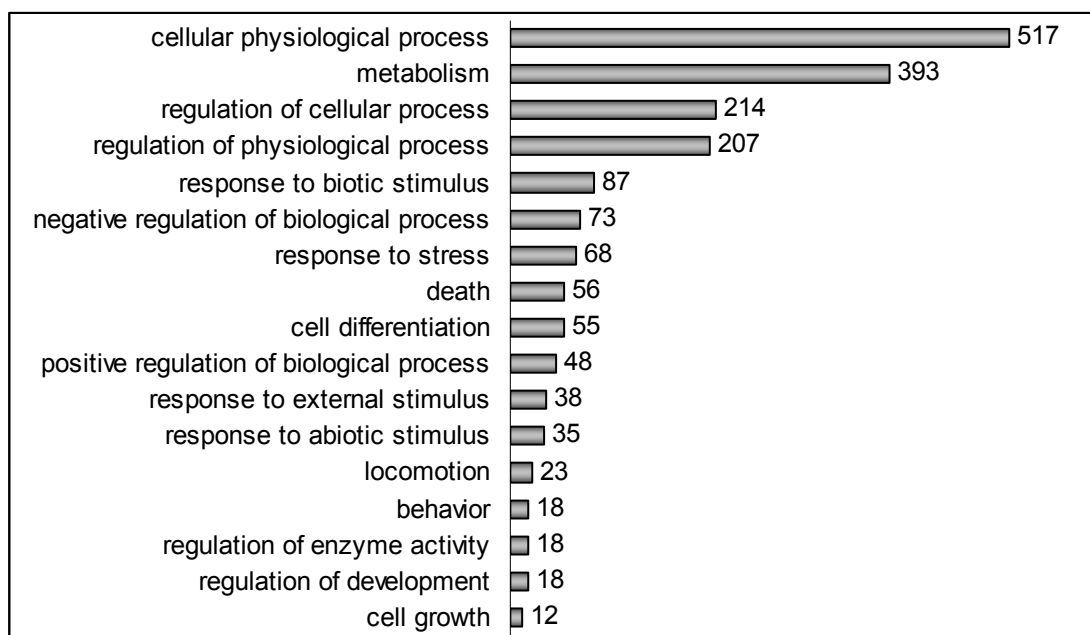


Abbildung 4: 44 K-Array - Funktionelle Annotation differentiell regulierter Gene nach GO Term BP_2. Die 1233 zwischen Milz und IEL mindestens 2-fach unterschiedlich regulierten Gene, wurden mittels DAVID (*Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery*) analysiert. 1133 *Accession Numbers* wurden von DAVID erkannt und bearbeitet. Die Gene wurden mit dem *Gene Ontology Term* Biologisches Produkt, Ebene 2 annotiert und mit dem Werkzeug *Functional Annotation Chart* unter Standardeinstellungen dargestellt. Die Zuordnung eines Gens zu mehreren funktionellen Gruppen ist bei dieser Darstellung möglich. 529 der analysierten Gene sind nicht in die Grafik eingeflossen. Neben den Balken ist die Anzahl der Gene, die dem jeweiligen Term zugeordnet wurden, angezeigt.

Außerdem wurden die Gene mit dem *Gene Ontology Term* Biologisches Produkt, Ebene 3 annotiert und mit dem Werkzeug *Functional Annotation Clustering* mit mittlerer Stringenz analysiert (Abbildung 5). 69 GO Terme wurden dabei nicht geclustert und sind nicht gezeigt. Nach dieser Darstellung sind ein Großteil der in den CD8 $\alpha\beta^+$ T-Zellen der IEL gegenüber dem Pendant aus der Milz differentiell regulierten Gene mit Metabolismus assoziiert, während die Gruppen um Verteidigungsantwort (*defense response*), Taxis und Stressantwort eher kleinere Anteile ausmachen.

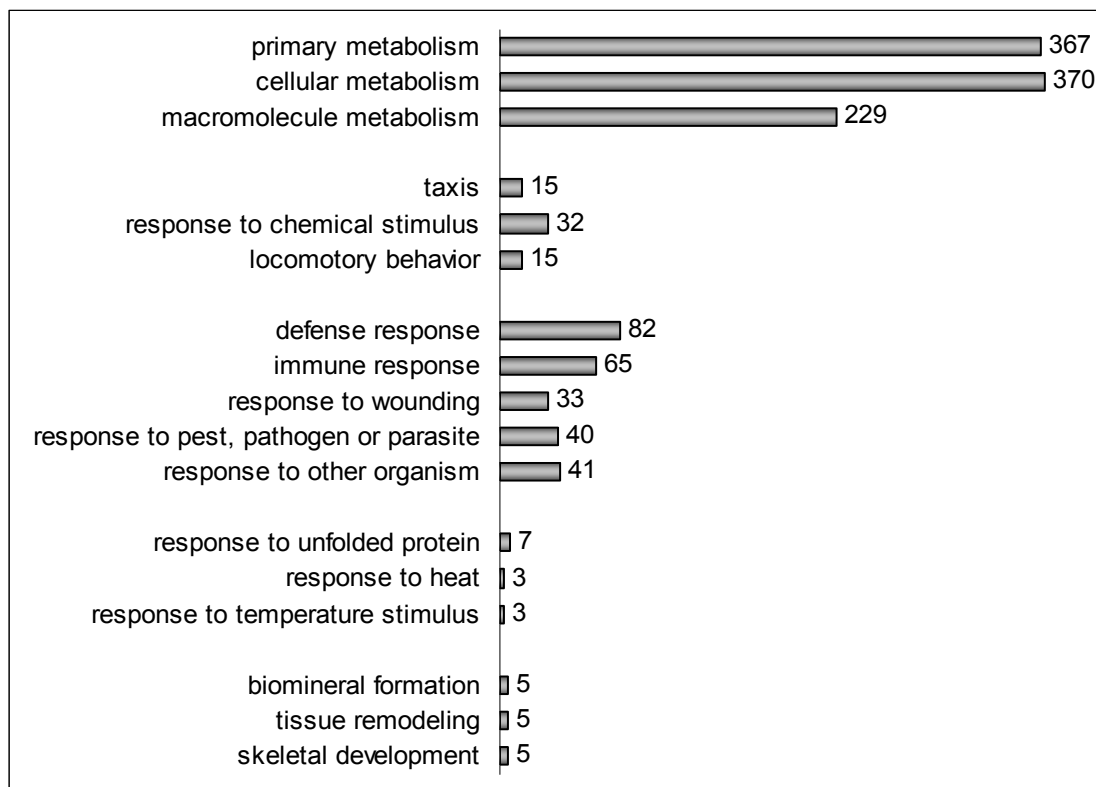


Abbildung 5: 44 K-Array – Clustering funktioneller Annotationen differentiell regulierter Gene, GO Term BP_3. Die 1233 zwischen Milz und IEL mindestens 2-fach unterschiedlich regulierten Gene, wurden mittels DAVID (*Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery*) analysiert. 1133 *Accession Numbers* wurden von DAVID erkannt und bearbeitet. Die Gene wurden mit dem *Gene Ontology Term* Biologisches Produkt, Ebene 3 annotiert und mit dem Werkzeug *Functional Annotation Clustering* mit mittlerer Stringenz analysiert. Die Zuordnung eines Genes zu mehreren funktionellen Gruppen ist bei dieser Darstellung möglich. 69 GO Terme wurden nicht geclustert. Neben den Balken ist die Anzahl der Gene, die dem jeweiligen Term zugeordnet wurden, angezeigt.

Über die Betrachtung der funktionellen Gruppierung von Genen hinaus wurden außerdem auf dem 44 K-Array als besonders stark differentiell reguliert erscheinende Gene betrachtet. Die hier in den IEL am stärksten differentiell exprimierten Gene (alle heraufreguliert) sind in Tabelle 7 aufgelistet. Für die Beurteilung, ob die so ausgewählten Gene tatsächlich alle auf Unterschiede in den antigenspezifischen CD8 $^+$ T-Zellen zurückgehen, oder ob hier

Verunreinigungen mit anderen Zelltypen hineinspielen, ist die starke Expression von Cadherin 1 (E-Cadherin), welches 69,7-fach heraufreguliert war und Integrin- α E, welches 47,9-fach heraufreguliert war, hervorzuheben. E-Cadherin wird von den Epithelzellen des Darmes exprimiert und kann daher eine Verunreinigung mit diesen Zellen anzeigen. Die Hochregulation von Integrin- α E, welches als Integrin α E β 7 die Adhäsion an E-Cadherin ermöglicht, ist dagegen für intraepitheliale CD8 T-Zellen im Dünndarm charakteristisch (Kilshaw und Murant, 90; Ericsson *et al.*, 04).

Direkt mit einer Funktion während einer Immunreaktion assoziiert werden konnten das *pancreatitis-associated protein* (Pap), welches mit einer 98,5-fachen Heraufregulation das am zweitstärksten differentiell regulierte Gen war, *CD152 antigen* (CTLA4), *chemokine (C-X-C motif) ligand 10* (IP-10) und das Gen *regenerating islet-derived 3 gamma*. Darüber hinaus befanden sich in der Liste der 20 in den IEL am stärksten regulierten Gene zwei Regulatoren des G-Protein-Signalings, RGS1 und RGS2. Letzteres war auch in den übrigen drei Experimenten in den IEL deutlich heraufreguliert (Tabelle 4). Unter den auf dem 44 K-Array differentiell regulierten Genen fanden sich außerdem noch RGS10 (8,3-fach heraufreguliert) und RGS16 (4,2-fach heraufreguliert).

Tabelle 7: Unterschiedlich regulierte Gene 44 K-Array.

| x-facher Unterschied zur Milz | Accession number | Sequenzname | Gen |
|-------------------------------|------------------|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 100,0 | NM_010234 | Fos | FBJ osteosarcoma oncogene |
| 98,5 | NM_011036 | Pap | pancreatitis-associated protein |
| 90,4 | NM_017399 | Fabp1 | fatty acid binding protein 1, liver |
| 69,7 | NM_009864 | Cdh1 | cadherin 1 |
| 47,9 | NM_008399 | Itgae | integrin, alpha E, epithelial-associated |
| 46,1 | AK007434 | 1810011H11Rik | Mus musculus 10 day old male pancreas cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:1810011H11, full insert sequence. |
| 42,5 | NM_015811 | Rgs1 | regulator of G-protein signaling 1 |
| 37,4 | NM_010444 | Nr4a1 | nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1 |
| 35,0 | NM_022021 | Cables | Cdk5 and Abl enzyme substrate |
| 32,3 | NM_010479 | Hspa1a | Mus musculus heat shock protein 1A (Hspa1a), mRNA [NM_010479] |
| 32,0 | NM_010591 | Jun | Jun oncogene |
| 28,5 | NM_011260 | Reg3g | regenerating islet-derived 3 gamma |
| 26,3 | NM_011823 | Gpr34 | G protein-coupled receptor 34 |
| 24,5 | NM_009397 | Tnfaip3 | tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3 |
| 24,0 | NM_009843 | Cd152 | CD152 antigen |
| 23,4 | NM_010118 | Egr2 | Mus musculus early growth response 2 (Egr2), mRNA [NM_010118] |
| 23,0 | NM_009061 | Rgs2 | regulator of G-protein signaling 2 |
| 23,0 | NM_033149 | B3galt5 | Mus musculus UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 5 (B3galt5), mRNA [NM_033149] |
| 21,6 | NM_172994 | Ppp2r2c | Mus musculus RIKEN cDNA 6330548O06 gene (6330548O06Rik), mRNA [NM_172994] |
| 21,4 | NM_021274 | Scyb10 | chemokine (C-X-C motif) ligand 10 |

Gezeigt sind die 20 Gene, die bei dem Vergleich der Expressionslevel in aus Milz und intestinalem Epithel gewonnenen antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen auf einem Gesamt-Mausgenom-Chip am stärksten differentiell reguliert waren.

4.1.2 NK-Rezeptoren auf CD8 $\alpha\beta$ ⁺ T-Zellen: gewebespezifische Expressionsmuster

Die Expression von NKR auf aktivierten CD8 T-Zellen ist beschrieben (Blaser *et al.*, 98) (McMahon *et al.*, 02; Voehringer *et al.*, 01; Beyersdorf *et al.*, 01; Moser *et al.*, 02; Jamieson *et al.*, 02; Assarsson *et al.*, 00). NKG2A und KLRG1 wirken inhibitorisch (Vance *et al.*, 98; Moser *et al.*, 02; Robbins *et al.*, 02), NKR-P1C, NKG2C, -D und -E sind aktivierend (Ljutic *et al.*, 05; Cerwenka *et al.*, 01; Vance *et al.*, 99), während 2B4 sowohl aktivierend als auch inhibierend wirken kann (Garni-Wagner *et al.*, 93; Lee *et al.*, 04b; Assarsson *et al.*, 05). Auf NK-Zellen wirkt die Stimulation dieser Rezeptoren mitunter direkt aktivierend bzw. inhibierend (Stewart *et al.*, 06), während ihr Einfluss auf die T-Zell-Aktivität kontrovers ist

(Ehrlich *et al.*, 05) (Guma *et al.*, 05). Überwiegend wird hier von einer kostimulierenden oder modulierenden Funktion ausgegangen. Die synchrone Veränderung der Expressionsstärke mehrerer dieser Rezeptoren auf im Darm befindlichen T-Zellen könnte also eine Veränderung der Aktivierbarkeit und Funktionalität dieser T-Zellen bewirken. Eine niedrigere Expression dieser Rezeptoren auf T-Zellen des Darmes als auf jenen aus der Blut oder Milz ist zumindest für NKG2D und KLRG1 beschrieben (Roberts *et al.*, 01; Robbins *et al.*, 03). Dieses Phänomen wurde jedoch bislang nicht näher charakterisiert. Die NKR, welche als Zelloberflächenmoleküle einer weiteren Analyse leicht zugänglich waren, wurden daher für eine detailliertere Untersuchung ausgewählt. Die entsprechenden Versuche und Ergebnisse sind in den folgenden Kapiteln dargestellt.

4.1.2.1 Validierung der Mikroarray-Daten mittels Durchflusszytometrie

Zunächst wurde untersucht, ob die in der Mikroarrayanalyse gezeigten Unterschiede in den RNA-Mengen der NKR in Zellen aus Milz und IEL auch auf Proteinebene vorhanden waren. Da es sich bei den NKR um Oberflächenmoleküle handelt und entsprechende mAk erhältlich waren, wurden antigenspezifische Zellen nach LmOVA-Infektion durchflusszytometrisch analysiert. C57BL/6 Mäuse wurden hierfür ig mit LmOVA infiziert und die Lymphozyten aus Milz, Leber, IEL und zusätzlich auch aus den MLN am Tag acht nach Infektion isoliert. Die MLN wurden untersucht, da in ihnen aus dem Darm stammende Antigene präsentiert werden und ihnen eine Rolle bei der Festlegung des Darmtropismus von T-Zellen zugeschrieben wird (Johansson-Lindbom *et al.*, 03; Iwata *et al.*, 04).

Die Zellen wurden mit mAk gegen CD8 α , CD62L und die entsprechenden NKR angefärbt. Zusätzlich wurden die Zellen mit OVA₂₅₇₋₂₆₄-Tetrameren gefärbt. Tote Zellen wurden mit 7-AAD angefärbt. Für NKG2A, -C und -E war zum Zeitpunkt dieser Untersuchung nur ein mAk verfügbar, welcher alle drei Rezeptoren erkennt. Bei der Auswertung der mittels Durchflusszytometrie gewonnenen Daten wurden zunächst tote Zellen ausgeschlossen und dann nur die CD8 α^+ , CD62L^{low} und OVA₂₅₇₋₂₆₄ Tetramer⁺ Populationen betrachtet, also die Zellpopulationen, die auch in der Mikroarray-Analyse untersucht wurden (Abbildung 6).

Die Oberflächenpräsenz der Rezeptoren auf antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen aus Milz und Leber war vergleichbar. Dahingegen war der prozentuale Anteil 2B4-positiver T-Zellen im Dünndarmepithel deutlich größer als in der Milz, während in den IEL deutlich geringere Anteile antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen mit den Ak gegen die übrigen Rezeptoren angefärbt wurden, als bei den Milzzellen.

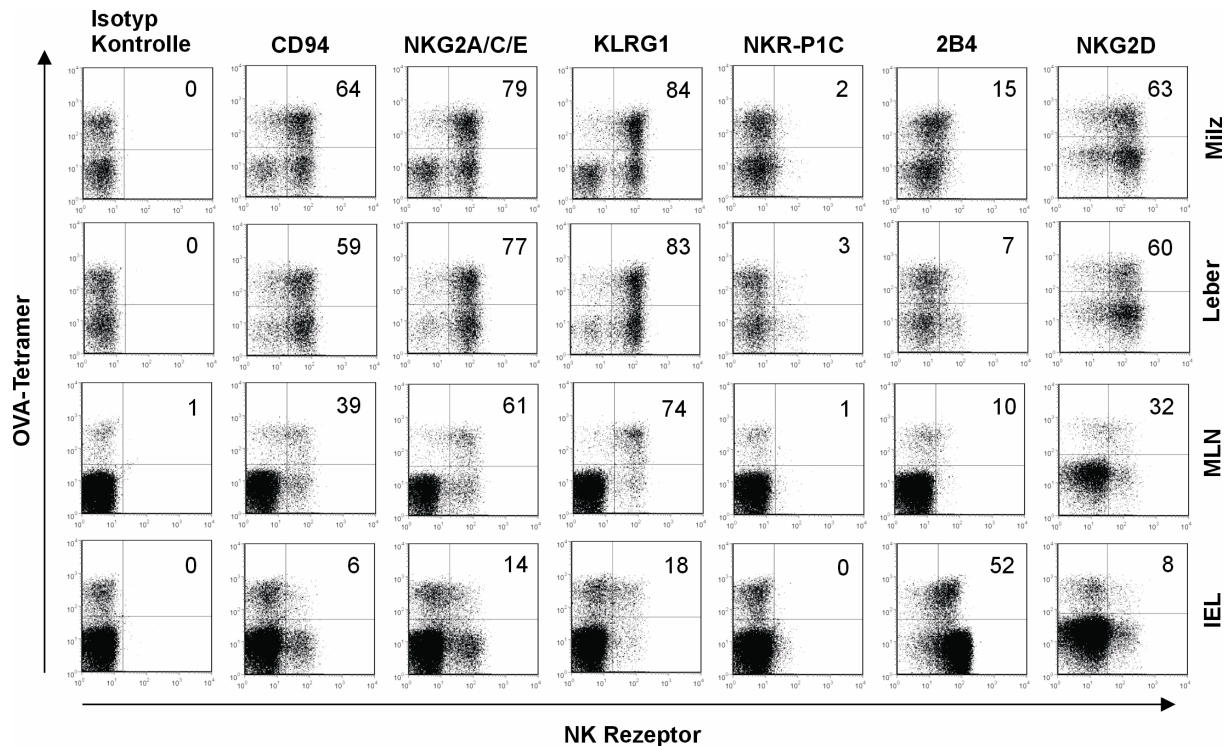


Abbildung 6: NK-Rezeptoren auf der Zelloberfläche von antigenspezifischen $CD8^+$ T-Zellen nach oraler LmOVA-Infektion. Acht Tage nach ig Infektion wurden Maus-Lymphozyten aus Milz, Leber, MLN und intestinale Epithel isoliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Gezeigt sind $CD8\alpha^+ CD62L^{low}$ T-Zellen. Die Zahl im oberen rechten Quadranten gibt den Prozentsatz der NKR^+ Zellen innerhalb der $OVA_{257-264}$ -Tetramer $^+$ Population an. Aufgenommen wurden vereinigte Zellpopulationen aus drei Mäusen. Die Graphik ist repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

Die auf RNA-Ebene beobachteten Verhältnisse konnten also auf Proteinebene wiedergefunden und bestätigt werden. Die Stärke des Unterschiedes variierte zwischen den RNA- und den Protein-Daten, aber auch in einem gewissen Rahmen zwischen einzelnen durchflusszytometrischen Analysen. Der Unterschied war jedoch mindestens 2-fach, meist deutlich stärker. Interessanterweise war auch bei den antigenspezifischen Zellen aus den MLN ein Unterschied in der Frequenz NKR-positiver Zellen gegenüber den Zellen aus der Milz erkennbar. Die Tendenz war hier für alle Rezeptoren außer 2B4 identisch zu der in den IEL. Allerdings war der Unterschied in der NKR-Expression zwischen T-Zellen aus den MLN und der Milz weit weniger stark als der zwischen T-Zellen aus den IEL und der Milz. Der Rezeptor NKR-P1C war auch auf aktivierten $CD8^+$ T-Zellen nur sehr schwach nachzuweisen. Daher wurde er in den folgenden Analysen nicht weiter berücksichtigt. Der Rezeptor 2B4 war im Gegensatz zu den übrigen Rezeptoren in den IEL heraufreguliert. Außerdem zeigte dieser Rezeptor in mehreren Versuchen ein gegenüber den anderen Rezeptoren inkonsistentes Verhalten, so z.B. die in den MLN zu den IEL gegensätzliche Tendenz. Daher wird auch dieser Rezeptor in den weiteren Ausführungen nicht berücksichtigt.

4.1.2.2 Untersuchung der NKR-Expression auf $CD8\alpha\beta^+$ und $CD8\alpha\alpha^+$ T-Zellen

Die Mikroarray-Analyse wurde in drei von vier Experimenten mit antigenspezifischen Zellen nach LmOVA-Infektion durchgeführt. In Experiment 1 wurden aber die gesamten $CD62L^{low}$ $CD8\alpha\beta^+$ T-Zellen nach Infektion verglichen. Hier war ebenfalls die Differenz in der NKR-Expression zwischen Zellen aus Milz und Dünndarmepithel zu beobachten (Tabelle 5). Auch mittels Durchflusszytometrie konnte diese Differenz auf aktivierten T-Zellen am Tag 9 nach LmOVA-Infektion beobachtet werden (nicht gezeigte Daten). Die NKR-Expression auf $CD8\alpha\alpha^+$ T-Zellen in den IEL war hierbei gleichstark oder noch geringer als auf $CD8\alpha\beta^+$ T-Zellen der IEL (nicht gezeigte Daten). Bei der durchflusszytometrischen Analyse von $CD8^+$ Zellen aus naiven Mäusen konnte auf den $CD8\alpha\beta^+$ sowie auf den $CD8\alpha\alpha^+$ T-Zellen aus dem Dünndarmepithel ebenfalls eine geringere NKR-Expression als auf $CD8\alpha\beta^+$ T-Zellen aus den Milzen dieser Tiere gemessen werden (nicht gezeigte Daten). Um eine möglichst große Vergleichbarkeit der Zellpopulationen aus den verschiedenen Organen zu gewährleisten, werden im folgenden soweit möglich aber nur $OVA_{257-264}$ -spezifische Zellen nach LmOVA-Infektion betrachtet.

4.1.2.3 Einfluss der Infektionsroute auf die NKR-Expression

Als nächstes wurde getestet, ob die unterschiedlich starke Expression von NKR auf antigenspezifischen $CD8^+$ T-Zellen in Milz und Dünndarmepithel eine Folge der ig Infektionsroute war, oder ob dieser Effekt auch nach iv Infektion beobachtet werden konnte. Hierfür wurden Mäuse ig oder iv mit LmOVA infiziert und am Tag 8 nach Infektion die NKR-Oberflächenpräsenz auf $OVA_{257-264}$ -spezifischen $CD8^+$ T-Zellen wie in Abschnitt 4.1.2.1 beschrieben analysiert. Der x-fache Unterschied der NKR-Expression auf Zellen aus IEL, MLN und Leber gegenüber der auf Milzzellen wurde durch Division der Frequenzen NKR-positiver Zellen innerhalb der antigenspezifischen $CD8^+$ T-Zellen der entsprechenden Organe ermittelt (Abbildung 7).

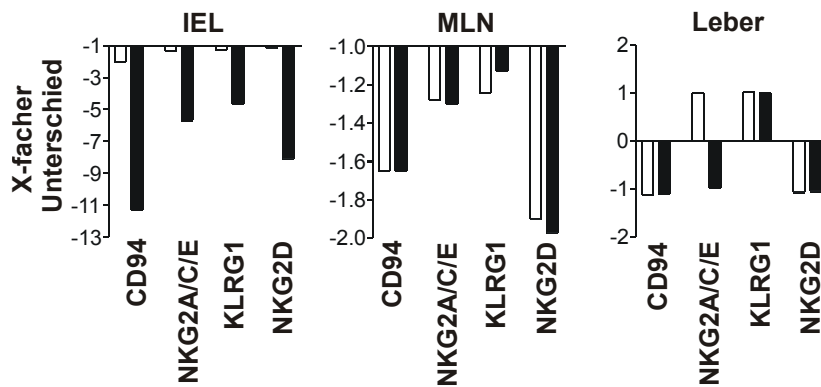


Abbildung 7: NKR auf der Zelloberfläche von antigenspezifischen $CD8^+$ T-Zellen nach oraler und iv Infektion. C57BL/6 Mäuse wurden ig (■) oder iv (□) mit LmOVA infiziert. Am Tag 8 nach Infektion wurden Lymphozyten aus Milz, Leber, MLN und intestinale Epithel isoliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Gezeigt sind die Unterschiede des prozentualen Anteils der NKR^+ Zellen innerhalb der $CD8\alpha^+ CD62L^{low}$ OVA₂₅₇₋₂₆₄-Tetramer⁺ Population aus den verschiedenen Geweben gegenüber dem entsprechenden Anteil in der Milz. Die Balken zeigen Werte für vereinigte Zellen aus drei Mäusen und sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

Die Frequenz der NKR^+ Zellen innerhalb der antigenspezifischen Zellen in der Milz war nach ig und iv Infektion annähernd gleich (nicht gezeigte Daten). Ein starker Unterschied zwischen der NKR-Expression in den IEL und der Milz war nur nach ig Infektion mit Lm zu verzeichnen. Eine etwas geringere Frequenz NKR-positiver Zellen in den IEL als in der Milz war aber auch nach iv Infektion zu beobachten. Die nur geringfügige Verringerung der NKR^+ Frequenzen in dem MLN konnte dagegen nach iv genauso wie nach ig Infektion gezeigt werden. In der Leber wurde nach Infektion über beide Routen keine veränderte NKR-Oberflächenexpression gegenüber der Milz festgestellt.

4.1.2.4 NKR-Expression in keimfreien Mäusen

Eine mögliche Erklärung für die Ursache der veränderten NKR-Expression in den IEL wäre, dass Komponenten der Darmflora einen direkten oder indirekten Einfluss auf die NKR-Expression haben. Es ist beschrieben, dass LPS die Expression von NKG2D-Liganden induzieren kann (Hamerman *et al.*, 04). Eine starke Abundanz von NKG2D-Rezeptor-Liganden wiederum wurde als Ursache für eine Verringerung der NKG2D-Rezeptor-Expression beschrieben (Groh *et al.*, 02) (Wiemann *et al.*, 05) (Oppenheim *et al.*, 05).

Um den Einfluss der Darmflora auf die NKR-Expression zu untersuchen, wurde die NKR-Expression in keimfreien Mäusen (Gnotobioten) analysiert. Zunächst wurde die Frequenz der NKR^+ Zellen innerhalb der $CD8\alpha\beta^+ CD62L^{low}$ Population aus verschiedenen Organen naiver Gnotobioten und naiver Mäuse, welche unter normalen pathogenfreien Bedingungen gehalten wurden (SPF-Mäuse), mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die Zellen aus Organen

zweier Mäuse pro Gruppe wurden dafür jeweils vereinigt. Der Anteil der CD62L^{low} Zellen an den CD8αβ⁺ T-Zellen war dabei in gleichen Organen beider Mausgruppen gleich groß. Der Anteil NKR-positiver Zellen an den CD8αβ⁺ CD62L^{low} Zellen naiver SPF-Mäuse war in allen untersuchten Organen geringer als der entsprechende Anteil an kürzlich aktivierten, antigenspezifischen Zellen bei infizierten Tieren (vergl. Abbildung 6 und 8A). Je nach Rezeptor schwankte dieser Anteil in Milz und Leber zwischen 20 % und 30 %. In naiven SPF-Mäusen konnte in den IEL gegenüber den Milzzellen ein deutlich verringerter, aber noch messbarer Anteil von NKR⁺ Zellen beobachtet werden. In den Gnotobioten waren die Frequenzen der NKR⁺ Zellen gegenüber denen in SPF-Mäusen in allen untersuchten Organen nochmals deutlich verringert (Abbildung 8A). Dennoch konnte auch hier in den IEL eine geringere NKR-Expression auf CD8αβ⁺ CD62L^{low} T-Zellen als in der Milz festgestellt werden.

Als nächstes wurden SPF-Mäuse und Gnotobioten ig mit LmOVA infiziert. Die keimfreien Mäuse erhielten dabei aufgrund ihrer höheren Suszeptibilität (Behnck, Manuskript in Vorbereitung) eine 10-fach geringere Infektionsdosis als die SPF-Tiere. Am Tag 9 nach Infektion wurden Lymphozyten aus Milz, Leber und intestinalem Epithel isoliert. Die Lymphozyten von je zwei Mäusen pro Gruppe und Organ wurden vereinigt, wie unter 5.1.2.1 beschrieben, gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Frequenzen antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen waren in beiden Gruppen gleich hoch. Nach Aktivierung wurden auch in den keimfreien Mäusen die untersuchten NK-Rezeptoren auf den CD8⁺ T-Zellen hochreguliert, so dass in der NKR-Expressions-Stärke zwischen SPF-Mäusen und Gnotobioten kaum ein Unterschied bestand (Abbildung 8A). Ob die NKR-Expression in den SPF-Mäusen oder der Gnotobioten stärker war, schwankte zwischen den einzelnen Versuchen, Rezeptoren und Organen. Das Verhältnis der Frequenzen NKR-positiver Zellen innerhalb der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen aus IEL und Leber zu denen innerhalb der entsprechenden Milzzellen war jedoch in der Tendenz konstant und eindeutig (Abbildung 8B). Auch in den Gnotobioten war nach Infektion die NKR-Expression im Darm substantiell geringer als in der Milz, auch wenn die Differenz für die NKG2-Rezeptoren in den Gnotobioten geringer ausfiel als in SPF-Mäusen. Die Darmflora beeinflusst also insgesamt den Anteil der NKR⁺ Zellen in allen untersuchten Organen, hat aber auf das Phänomen der niedrigeren Expression im Darm gegenüber der Milz, wenn überhaupt, nur partiellen Einfluss.

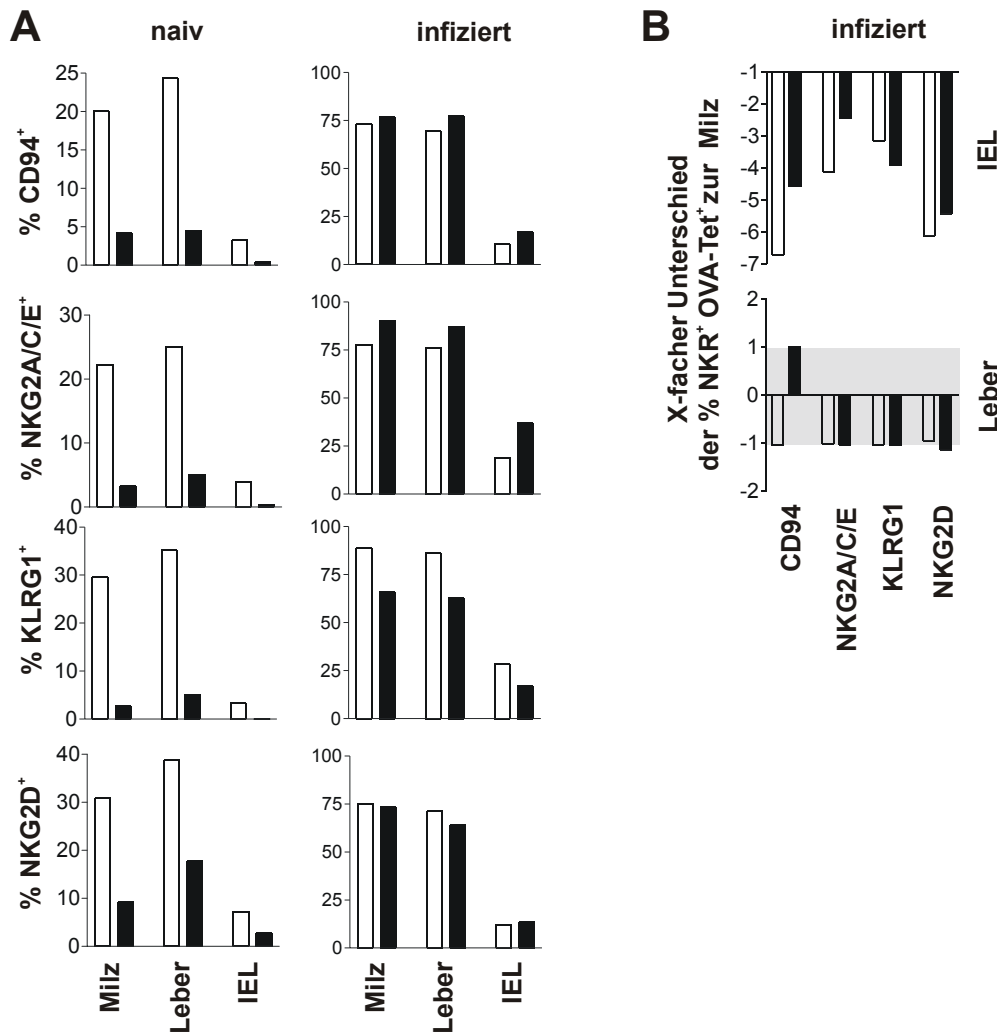


Abbildung 8: NKR-Expression auf CD8⁺ T-Zellen aus Gnotobioten. (A) Frequenz der NKR⁺ Zellen innerhalb der CD8 α β ⁺CD62L^{low} (naiv) und der CD8 α β ⁺ CD62L^{low} OVA₂₅₇₋₂₆₄-Tetramer⁺ Population (infiziert). (B) Unterschiede des prozentualen Anteils der NKR⁺ Zellen innerhalb der CD8 α β ⁺ CD62L^{low} OVA₂₅₇₋₂₆₄-Tetramer⁺ Population (infiziert) aus den verschiedenen Geweben gegenüber dem Anteil an entsprechenden Milzzellen. Gnotobioten (■) und SPF-Tiere (□) blieben unbehandelt oder wurden ig mit LmOVA infiziert. Am Tag 9 nach Infektion wurden Lymphozyten aus Milz, Leber und intestinale Epithel isoliert. Die Lymphozyten von je zwei Mäusen pro Gruppe und Organ wurden vereinigt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Grafik ist repräsentativ für zwei (naiv) bzw. drei (infiziert) unabhängige Experimente. Y-Achsen Bereich von -1 bis 1, keine Veränderung gegenüber der Milz (■).

4.1.2.5 Einfluss von TGF β auf die Gewebespezifische NKR-Expression

Es ist beschrieben, dass der *transforming growth factor* β (TGF β) die Oberflächenpräsenz von NKG2D verringern kann (Castriconi *et al.*, 03; Lee *et al.*, 04a). Da außerdem bekannt ist, dass im Darm eine erhöhte TGF β -Konzentration vorliegt (Koyama und Podolsky, 89), wurde untersucht, ob dieses Zytokin für die verminderte NKR-Expression in den IEL verantwortlich ist. Um diese Fragestellung zu beantworten, wurden transgene CD4dnTGF β RII Mäuse verwendet (Gorelik und Flavell, 00). Diese Tiere exprimieren auf den T-Zellen einen dominant-negativen TGF β -Rezeptor II, der zwar alle drei Isoformen des TGF β bindet, aber

zu keiner Signaltransduktion befähigt ist. Die T-Zellen haben also, wenn überhaupt, nur eine stark eingeschränkte Kapazität, TGF β -Signale wahrzunehmen. Sollte das TGF β -Signaling für die gewebespezifische NKR-Expression auf CD8 $^+$ T-Zellen eine Rolle spielen, so müssten die Expressionsdifferenzen zwischen diesen Zellen aus Milz und IEL in den transgenen Tieren geringer sein.

Zunächst wurde wieder die NKR-Expression auf CD62L low CD8 $\alpha\beta^+$ T-Zellen naiver Mäuse untersucht, wobei transgene- mit wildtyp-Mäusen verglichen wurden. In einem zweiten Schritt wurden dann ig mit LmOVA infizierte Tiere am Tag 8 nach Infektion untersucht. Es wurden je drei Tiere pro Gruppe analysiert. Da für NKG2D ein Einfluss des TGF β beschrieben ist, und dieser Rezeptor somit im Fokus lag, wurden mit dem mAk gegen NKG2D die Zellen aller drei Mäuse pro Gruppe individuell gefärbt. Für die Färbung mit anti-NKG2A/C/E mAk und anti-KLRG1 mAk wurden hingegen die Zellen der jeweiligen Organe pro Gruppe vereinigt.

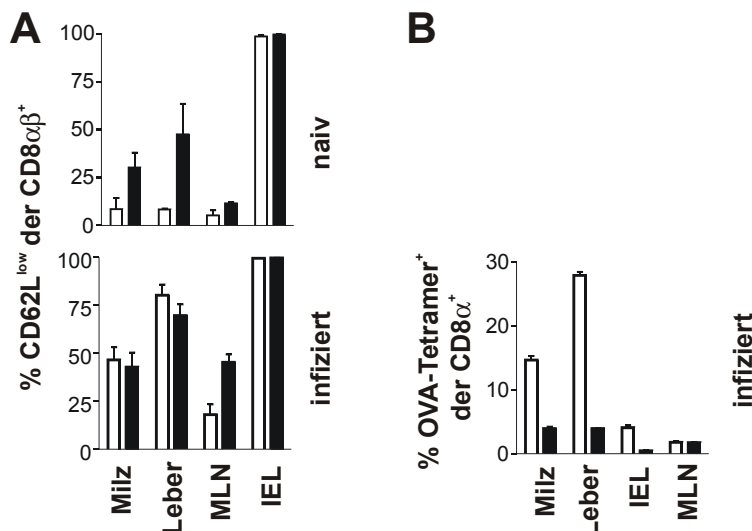


Abbildung 9: CD62L Expression und OVA-Tetramer-Frequenzen von CD8 $^+$ T-Zellen aus naiven und infizierten CD4dnTGF β RII Tieren. Die Tiere blieben unbehandelt oder wurden mit 4×10^9 LmOVA ig infiziert und 8 Tage später analysiert. Lymphozyten aus Milz, Leber, MLN und intestinalem Epithel von CD4dnTGF β RII (■) und C57BL/6 Mäusen (□) wurden isoliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. (A) Gezeigt ist der prozentuale Anteil der CD62L low Zellen an der CD8 $\alpha\beta^+$ T-Zellpopulation in den verschiedenen Geweben. (B) Prozentualer Anteil von OVA $_{257-264}$ -Tetramer $^+$ Zellen innerhalb der CD8 α^+ T-Zellen. Die Balken geben Mittelwerte \pm SD für drei individuell analysierte Mäuse pro Gruppe an. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

In Übereinstimmung mit bereits beschriebenen Beobachtungen (Gorelik und Flavell, 00) war in naiven CD4dnTGF β RII Tieren in Milz, Leber und MLN ein weit größerer Anteil der CD8 $\alpha\beta$ ⁺ T-Zellen negativ für CD62L als in naiven wt Tieren (Abbildung 9A). Nach einer Lm-Infektion wiesen die CD8⁺ T-Zellen in Milz, Leber und IEL von CD4dnTGF β RII Tieren und wt Mäusen in etwa gleich große Anteile an CD62L^{low} Zellen auf. In den MLN war auch nach einer Infektion in den transgenen Tieren ein größerer Prozentsatz von CD62L^{low} Zellen innerhalb der CD8⁺ T-Zell-Population messbar. Die Frequenzen der OVA₂₅₇₋₂₆₄-Tetramer⁺ Zellen an den CD8 $\alpha\beta$ ⁺ T-Zellen war dahingegen in den transgenen Tieren deutlich niedriger als in mit einer gleichen Dosis LmOVA infizierten wt Kontrolltieren (Abbildung 9B).

In naiven CD4dnTGF β RII Tieren waren die Rezeptoren NKG2A/C/E, KLRG1 und NKG2D in der Regel auf CD8 $\alpha\beta$ ⁺ CD62L^{low} CD8⁺ T-Zellen aus der Milz und aus dem Darm deutlich stärker (2- bis 5-fach) exprimiert, als in wt Mäusen. Die Unterschiede in der NKR-Expression zwischen Milz- und IEL-Zellen waren auch in transgenen Tieren sichtbar, aber weniger stark ausgeprägt als in wt Tieren (Abbildung 10).

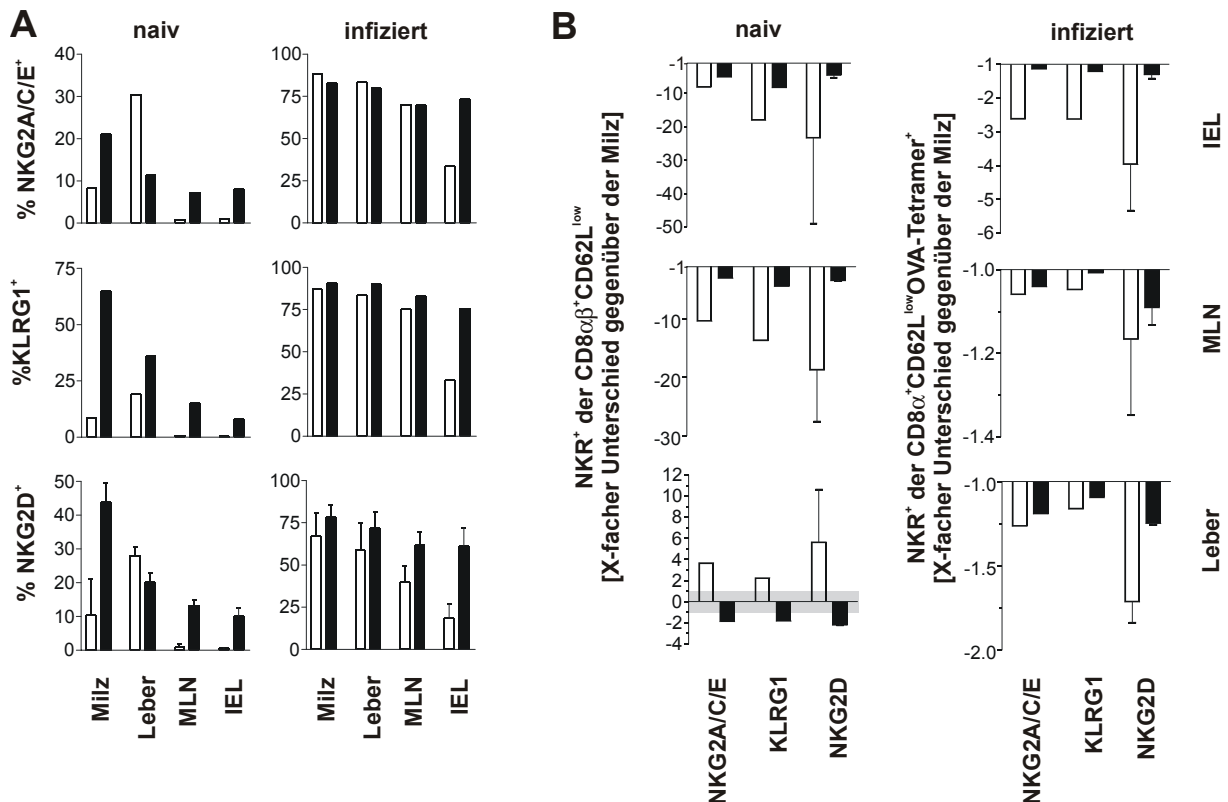


Abbildung 10: NK-Rezeptor-Expression auf CD8⁺ T-Zellen aus CD4dnTGFβRII Mäusen. (A) Frequenz der NKR⁺ Zellen innerhalb der CD8αβ⁺CD62L^{low} (naive) und der CD8α⁺ CD62L^{low} OVA₂₅₇₋₂₆₄-Tetramer⁺ Population (infiziert). (B) Unterschiede des prozentualen Anteils der NKR⁺ Zellen innerhalb der CD8αβ⁺CD62L^{low} (naive) und der CD8α⁺ CD62L^{low} OVA₂₅₇₋₂₆₄-Tetramer⁺ Population (infiziert) aus den verschiedenen Geweben gegenüber dem entsprechenden Anteil in der Milz. CD4dnTGFβRII (■) und C57BL/6 Mäuse (□) blieben unbehandelt oder wurden ig mit 4×10^9 LmOVA infiziert. Am Tag 8 nach Infektion wurden Lymphozyten aus Milz, Leber, MLN und intestinale Epithel isoliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Balken zeigen Mittelwerte \pm SD dreier individuell analysierter Mäuse pro Gruppe (NKG2D), oder Werte für vereinigte Zellen aus drei Mäusen (NKG2A/C/E, KLRG1) und sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente. Der Y-Achsen Bereich von -1 bis 1 (keine Veränderung gegenüber der Milz) ist grau unterlegt.

Eine größere Homogenität und damit Vergleichbarkeit der Zellpopulationen wurde aber zwischen den antigenspezifischen T-Zellen nach Lm-Infektion angenommen. Am Tag 8 nach ig LmOVA-Infektion waren die Frequenzen der NKR⁺ Zellen für die drei untersuchten Rezeptoren in Milz und Leber transgener und wt Mäuse annähernd gleich. Für die MLN schwankten die Daten zwischen den einzelnen Versuchen, so dass hier keine eindeutige Aussage möglich ist. Die niedrigere NKR-Expression in den IEL, die in wt Mäusen beobachtet wurde, war in den CD4dnTGFβRII Tieren nicht bzw. nur sehr schwach zu erkennen (Abbildung 10).

Bei Mäusen, deren T-Zellen keine TGFβ-Signale empfangen und umsetzen konnten, war also die Differenz der NKR-Expression auf aktivierten CD8⁺ T-Zellen aus Milz und Darm in naiven Tieren geringer als in wt-Tieren. Nach Infektion war auf den antigenspezifischen Zellpopulationen die Differenz zwischen der NKR-Expression in den beiden Organen fast

komplett aufgehoben. Am stärksten war der für TGF β beobachtete Einfluss auf die NKG2D-Expression, aber auch NKG2A/C/E und KLRG1 werden nach diesen Ergebnissen durch TGF β -Signale reguliert.

4.2 Analyse der Kapazität von Leber- und Darmgewebe zur Induktion primärer und sekundärer T-Zell-Antworten gegen *Listeria monocytogenes*.

Im Folgenden wurde die Erforderlichkeit sekundärer lymphoider Gewebe für die Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen während einer primären und einer sekundären Lm-Infektion untersucht. Nach Hinweisen auf eine T-Zell-Aktivierung auch in nicht-lymphoiden, peripheren Geweben (Feuerer *et al.*, 03; Klein und Crispe, 06; Wuensch *et al.*, 06; Lund *et al.*, 02; Moyron-Quiroz *et al.*, 04) sollte geprüft werden, ob nach einer Infektion mit Listerien z.B. im Darm oder in der Leber eine solche Aktivierung stattfinden kann. Ein System, in dem eine solche Fragestellung bearbeitet werden kann, sind LTβR^{-/-} Mäuse. Diese Tiere entwickeln weder Lymphknoten noch MALT (Futterer *et al.*, 98). Vorausgehende Arbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass in LTβR^{-/-} Mäusen, denen einige Wochen vor Infektion mit Lm die Milz operativ entfernt wurde, keine Induktion von T-Zell-Antworten stattfand. Eine Splenektomie infizierter LTβR^{-/-} Mäuse verhinderte außerdem weitestgehend die Entwicklung einer Sekundärantwort nach Re-Infektion (Kursar und Jänner Manuskript eingereicht). Diese Ergebnisse implizieren, dass lymphoide Organe für die Induktion sowohl einer primären als auch einer sekundären Immunantwort essentiell sind. Da aber nicht ausgeschlossen werden konnte, dass der LTβR nicht nur für die Entwicklung sekundärer lymphoider Organe nötig ist, sondern auch einen direkten Einfluss auf die Induktion und Erhaltung einer T-Zell-Antwort hat, wurde die oben skizzierte Fragestellung in einem alternativen Model untersucht. Die entsprechenden Versuche sind im nachfolgenden beschrieben.

Um zu verhindern, dass in sekundären lymphoiden Geweben aktivierte T-Zellen in nicht-lymphoide Gewebe einwandern, wurde hier die immunsupprimierende Substanz FTY720 eingesetzt, welche die Migration von T-Zellen aus Lymphknoten in periphere Gewebe verhindert. Da FTY720 T-Zellen in der Milz nur unvollständig zurückhält (Mandala *et al.*, 02), wurden auch Versuchstiergruppen untersucht, denen vor einer Infektion die Milz entfernt wurde.

4.2.1 Einfluss von FTY720 auf die Dissemination und Eradikation von Lm

Zunächst wurde untersucht, ob eine FTY720-Behandlung einen Einfluss auf die Dissemination der Bakterien oder die Fähigkeit von Mäusen, eine Infektion mit Listerien zu

kontrollieren, hat. Hierfür wurden Mäuse ig oder iv mit Lm infiziert. An verschiedenen Tagen nach der Infektion wurde der Bakteriengehalt verschiedener Organe bestimmt (Abbildung 11). Eine Behandlung mit FTY720 veränderte den Verlauf der Lm-Infektion weder in Hinsicht auf die Dissemination noch hinsichtlich der Clearance der Bakterien in Milz, Leber und MLN nach ig oder iv Infektion.

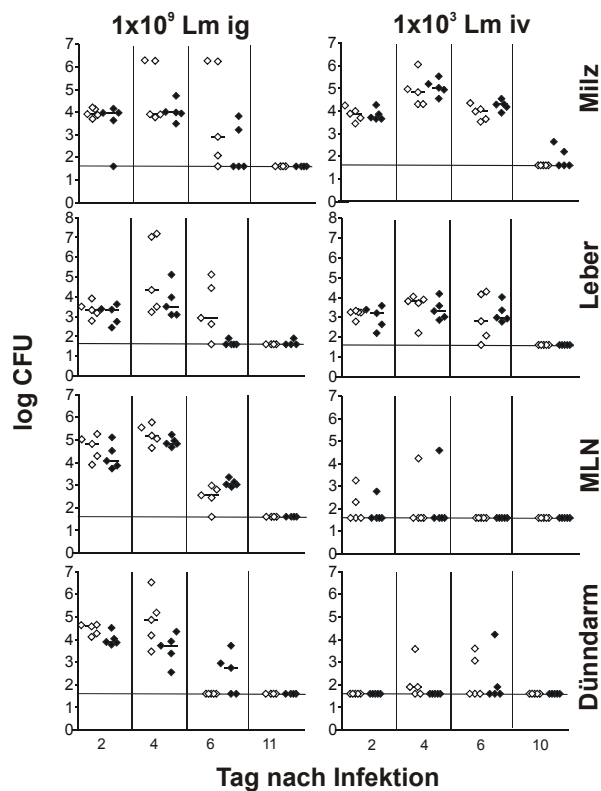


Abbildung 11: Lm-Titer in FTY720 behandelten Mäusen. C57BL/6 Mäuse erhielten Trinkwasser mit 5 µg/ml FTY720 (◆) oder blieben unbehandelt (◇). Einen Tag später wurden die Mäuse iv mit 1×10^3 oder ig mit 1×10^9 Lm infiziert. An den angegebenen Tagen nach der Infektion wurden die Tiere getötet und die Bakterientiter in Milz, Leber, MLN und Dünndarm bestimmt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 2 unabhängige Experimente je Infektionsroute.

4.2.2 Einfluss von FTY720-Behandlung und Splenektomie auf die primäre T-Zellantwort nach oraler Infektion

Der Einfluss von FTY720 und/oder Splenektomie auf die Entstehung von T-Zell-Antworten wurde zunächst nach ig Infektion mit 2×10^9 LmOVA analysiert. Drei Wochen vor der Infektion, wurde ein Teil der Mäuse splenektomiert und 24 h vor der Infektion mit 5 µg/ml FTY720 im Trinkwasser behandelt. Neun Tage nach der Infektion wurden die T-Zell-Antworten in Milz, Leber, MLN und Dünndarmepithel mittels Durchflusszytometrie

analysiert. Zur Analyse der CD8⁺ T-Zell-Antworten wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD8 α , CD62L und mit OVA₂₅₇₋₂₆₄-Tetrameren gefärbt. CD4⁺ T-Zell-Antworten wurden mittels einer intrazellulären IFN γ -Färbung untersucht. Hierfür wurden die Zellen mit dem immundominanten Listeriolysin-O-Peptid LLO₁₉₀₋₂₀₁ restimuliert und nachfolgend mit mAk gegen CD4 und gegen IFN γ gefärbt.

Die FTY720-Behandlung hatte eine substantielle Reduktion der Gesamtzahl an CD8⁺ T-Zellen in Milz und Leber, aber nicht in den MLN und dem intestinale Epithel zur Folge (Abbildung 12). Die Frequenzen der OVA₂₅₇₋₂₆₄-spezifischen CD8⁺ T-Zellen waren, wenn überhaupt, in allen untersuchten Geweben nur leicht reduziert. Aufgrund der Verringerung der Gesamt-CD8⁺-T-Zell-Zahlen konnte für Milz und Leber trotzdem eine signifikante Verringerung der Zahl OVA₂₅₇₋₂₆₄-spezifischer CD8⁺ T-Zellen festgestellt werden. Die Splenektomie veränderte die Frequenzen und absoluten Zellzahlen OVA₂₅₇₋₂₆₄-spezifischer CD8⁺ T-Zellen nur marginal gegenüber den nicht splenektomierten Tieren. Insgesamt wurden nach FTY720-Behandlung und oraler Infektion mit LmOVA verminderte, aber dennoch starke antigenspezifische Antworten in allen analysierten Organen gemessen.

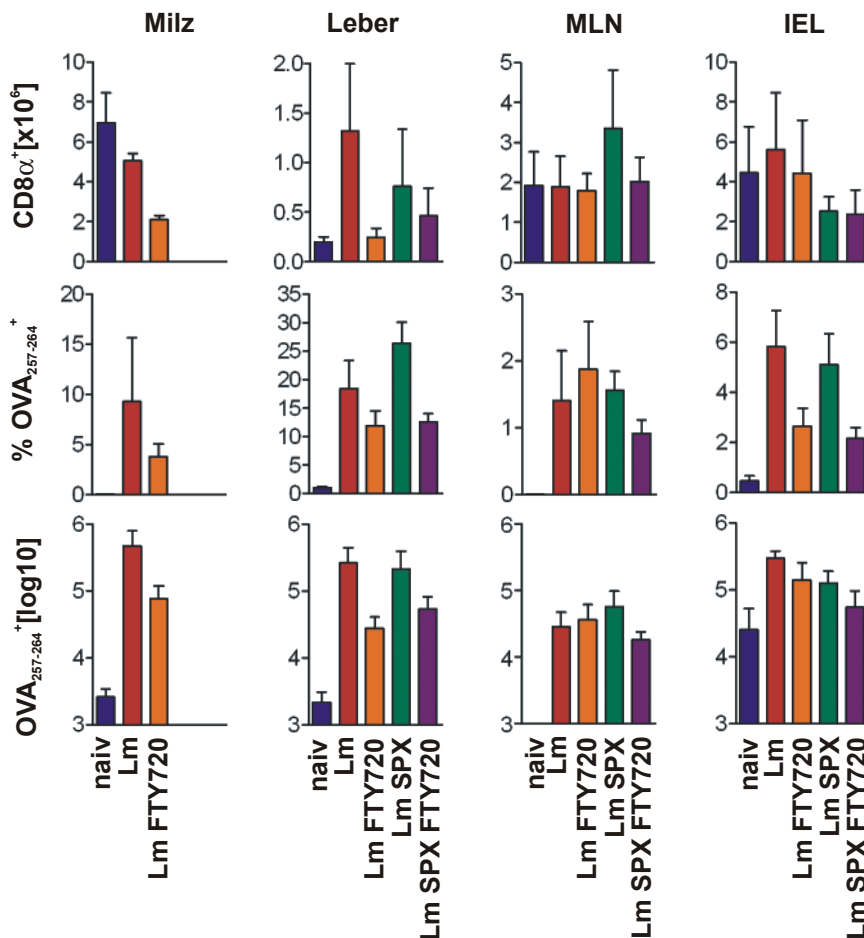


Abbildung 12: Primäre CD8⁺ T-Zell-Antwort nach oraler Infektion von FTY720-behandelten und splenektomierten Mäusen. C57BL/6 Mäuse wurden ig mit 2×10^9 LmOVA infiziert. Drei Wochen vor der Infektion, wurden die Mäuse splenektomiert (SPX) und 24 h vor der Infektion mit 5 µg/ml FTY720 im Trinkwasser behandelt (FTY720). Neun Tage nach der Infektion wurden die CD8⁺ T-Zell-Antworten in Milz, Leber, MLN und Dünndarmepithel (IEL) mittels OVA₂₅₇₋₂₆₄-Tetrameren analysiert. Die Abbildung zeigt die Gesamtzahl der CD8α⁺ T-Zellen pro Organ, die Prozentwerte der OVA₂₅₇₋₂₆₄-Tetramer⁺ CD62L^{low} Zellen innerhalb der CD8α⁺ T-Zellen und die absoluten Zahlen der OVA₂₅₇₋₂₆₄-Tetramer⁺ CD62L^{low} CD8α⁺ T-Zellen (log10 Skalierung). Die Balken zeigen den Mittelwert ± SD von drei individuell analysierten Mäusen pro Gruppe. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Eine FTY720-Behandlung reduzierte die CD4⁺ T-Zellzahlen in Milz und Leber, veränderte die CD4⁺ T-Zellzahlen in MLN und Dünndarmepithel aber nur geringfügig (Abbildung 13 und nicht gezeigte Daten). In der Milz konnten niedrige Frequenzen LLO₁₉₀₋₂₀₁-spezifischer CD4⁺ T-Zellen gemessen werden. Die Behandlung mit FTY720 reduzierte diese Frequenzen, sodass die Gesamtzahlen nach Antigenrestimulation IFNγ-produzierender CD4⁺ T-Zellen sich in dem Bereich des unspezifischen Hintergrundes befanden. In der Leber bewirkte die FTY720-Behandlung eine Reduktion und die Splenektomie eine geringe Erhöhung der Frequenzen LLO₁₉₀₋₂₀₁-spezifischer CD4⁺ T-Zellen. Betrachtet man jedoch die Gesamtzellzahlen, dann zeigten sowohl FTY720-behandelte als auch zusätzlich splenektomierte Tiere nur eine sehr schwache CD4⁺-Antwort, wohingegen die Splenektomie alleine keinen Einfluss

auf die Gesamtzahl der LLO₁₉₀₋₂₀₁-spezifischen CD4⁺ T-Zellen in der Leber hatte. Obwohl auch in den MLN infizierter Mäuse LLO₁₉₀₋₂₀₁-spezifische CD4⁺ T-Zellen detektiert werden konnten, waren die Frequenzen nach Lm-Infektion bereits in unbehandelten Mäusen zu nahe an den Hintergrundwerten, weshalb verlässliche Aussagen über die Veränderungen der CD4⁺ T-Zellantworten unter verschiedenen Bedingungen nicht möglich waren (nicht gezeigte Daten). Im Dünndarmepithel verursachte die FTY720-Behandlung eine Verminderung der Frequenzen antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen. Trotzdem konnten auch in splenektomierten und nachfolgend FTY720-behandelten Mäusen noch größere Mengen antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen werden.

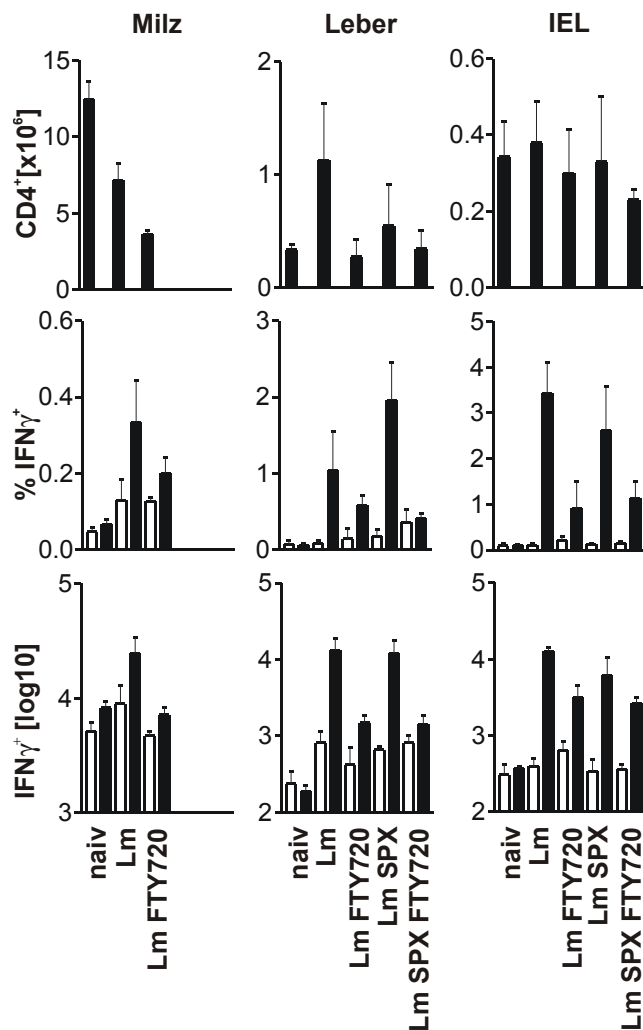


Abbildung 13: Primäre $CD4^+$ T-Zell-Antwort nach oraler Infektion von FTY720-behandelten und splenektomierten Mäusen. C57BL/6 Mäuse wurden mit 2×10^9 LmOVA infiziert. Drei Wochen vor der Infektion, wurden die Mäuse splenektomiert (SPX) und 24 h vor der Infektion mit 5 $\mu\text{g/ml}$ FTY720 im Trinkwasser behandelt (FTY720). Neun Tage nach der Infektion wurden die Lymphozyten aus Milz, Leber und Dünndarmepithel (IEL) isoliert und mit 10^{-6}M LLO₁₉₀₋₂₀₁-Peptid (■) oder ohne Peptid (□) inkubiert. Nach 5 h wurden die Zellen extrazellulär mit anti- $CD4$ mAk und intrazellulär mit anti- $IFN\gamma$ mAk gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Abbildung zeigt die Gesamtzahl der $CD4^+$ T-Zellen, die Prozentwerte der $IFN\gamma^+$ Zellen innerhalb der $CD4^+$ Zellen und die Gesamtzahl der $IFN\gamma^+$ $CD4^+$ Zellen (\log_{10}). Die Balken zeigen den Mittelwert \pm SD von drei individuell analysierten Mäusen pro Gruppe. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

4.2.3 Einfluss von FTY720-Behandlung und Splenektomie auf die Primärantwort nach intravenöser Infektion

Inwieweit FTY720 die Emigration von Lymphozyten aus Strukturen wie den isolierten lymphoiden Follikeln und den Cryptopatches der Darmmukosa und aus Darm-assoziierten lymphoiden Geweben blockiert, ist unklar. Um zu beurteilen, ob die nach oraler LmOVA-Infektion beobachteten T-Zell-Antworten in der intestinalen Mukosa oder in Darm-assoziierten-lymphoiden-Gewebe induziert wurden, wurden die T-Zell-Antworten nach iv LmOVA-Infektion untersucht. Nach iv Infektion ist die Dissemination der Listerien haupt-

sächlich auf Milz und Leber beschränkt (Abbildung 11). Neun Tage nach einer Infektion mit 5000 LmOVA-Organismen konnten deutliche OVA₂₅₇₋₂₆₄-spezifische CD8⁺ T-Zellantworten in Milz und Leber gemessen werden (Abbildung 14A). Die Behandlung mit FTY720 reduzierte die Frequenzen antigenspezifischer CD8⁺ Zellen in der Milz, aber nicht in der Leber. Aufgrund der Verringerung der absoluten Lymphozyten-Zahlen in beiden Organen unter FTY720-Behandlung war aber auch die Zahl der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen in Milz und Leber signifikant vermindert. Das vorherige Entfernen der Milz reduzierte die Frequenzen und Gesamtzahlen antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen in der Leber zusätzlich. Diese Werte variierten allerdings in recht starkem Ausmaß zwischen individuell analysierten Tieren. Eine mögliche Ursache für diese Varianz könnte eine unterschiedlich starke Ausbreitung der Bakterien in den Mäusen sein. In einigen Mäusen könnte die Dissemination auf Milz und Leber beschränkt bleiben, während in anderen auch andere lymphoide und nicht-lymphoide Gewebe, insbesondere auch der Darmtrakt, erreicht werden (siehe auch Abbildung 11).

Um eine über Milz und Leber hinausgehende Verbreitung der Bakterien in den Mäusen zu verhindern, wurden diese mit nur 500 Bakterien infiziert. Zusätzlich wurden die Bakterien am Tag 2 nach Infektion mittels Ampicillin-Behandlung wieder eliminiert, um eine sekundäre Dissemination zu verhindern. Unter diesen Bedingungen konnten immer noch starke T-Zell-Antworten auf eine LmOVA-Infektion in ansonsten unbehandelten Mäusen beobachtet werden (Abbildung 14B). Sowohl die Splenektomie als auch die FTY720-Behandlung reduzierten die Anzahl OVA₂₅₇₋₂₆₄-spezifischer CD8⁺ T-Zellen. Bei Tieren, die beide Behandlungen erfuhren, konnten praktisch keine CD8⁺ T-Zell-Antworten mehr gemessen werden.

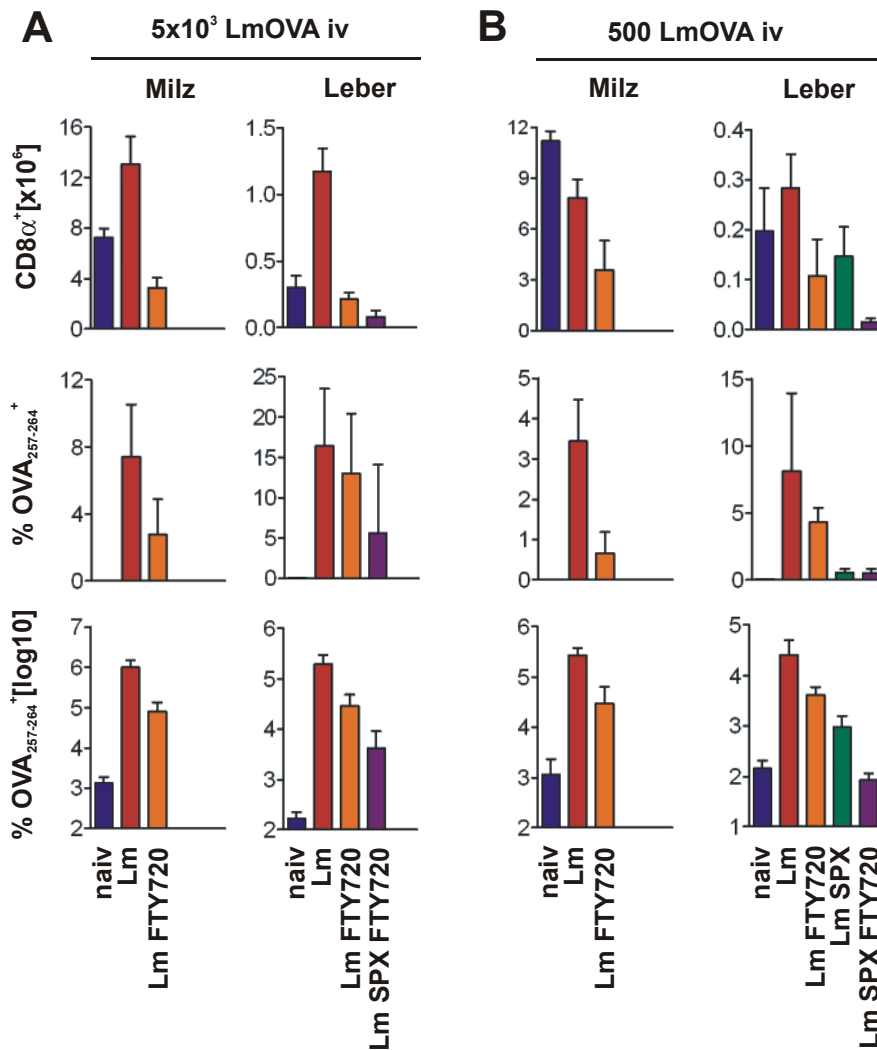


Abbildung 14: Primäre CD8⁺ T-Zell-Antwort nach iv Infektion von FTY720-behandelten und splenektomierten Mäusen. C57BL/6 Mäuse wurden iv mit 5×10^3 (A) oder 500 (B) LmOVA infiziert. Drei Wochen vor der Infektion, wurden die Mäuse splenektomiert (SPX) und 24 h vor der Infektion mit 5 μ g/ml FTY720 im Trinkwasser behandelt (FTY720). Neun Tage nach der Infektion wurden die CD8⁺ T-Zell-Antworten in Milz und Leber mittels OVA₂₅₇₋₂₆₄-Tetrameren analysiert. Die Abbildung zeigt die Gesamtzahl der CD8 α^+ T-Zellen pro Organ, die Prozentwerte der OVA₂₅₇₋₂₆₄-Tetramer⁺ CD62L^{low} Zellen innerhalb der CD8 α^+ T-Zellen und die absoluten Zahlen der OVA₂₅₇₋₂₆₄-Tetramer⁺ CD62L^{low} CD8 α^+ T-Zellen (log10-Skalierung). Die Balken zeigen Mittelwerte \pm SD von drei individuell analysierten Mäusen pro Gruppe. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei (A) bzw. drei (B) unabhängige Experimente.

Da eine längere Behandlung mit FTY720 zu einer substantiellen Depletion peripherer T-Zellen führt (Cose *et al.*, 06; Brinkmann, 04), könnte die in den vorangehenden Experimenten beobachtete Reduktion der T-Zell-Antworten zumindest zum Teil auf eine verminderte Verfügbarkeit naiver Vorläuferzellen für das Priming zurückzuführen sein. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurden Thy1.1⁺ kongene C57BL/6 Mäuse iv mit 1000 LmOVA infiziert. Einen Tag nach der Infektion wurden in diese Mäuse gereinigte, naive CD8⁺ T-Zellen aus OT1 Mäusen (Thy1.2⁺), einem Mausstamm, der transgen für einen OVA₂₅₇₋₂₆₄-spezifischen TZR ist (Foulds *et al.*, 02), transferiert. Hierfür wurden aus den Lymphozyten

von Milz, MLN und PLN der OT1 Mäuse die $CD8^+ CD62L^{high}$ Zellen mittels magnetischer Zellsortierung isoliert. Aus den vereinigten Lymphozyten wurden zunächst mit FITC-markierten mAk und anti-FITC-Beads die $CD4^+$, $B220^+$ und $MHC-II^+$ Zellen depletiert. Anschließend wurde mit anti- $CD62L$ -Beads eine positiv-Selektion durchgeführt. Vor dem Transfer wurden die OT1-Zellen CFSE-markiert, um die *in-vivo*-Proliferation der Zellen bestimmen zu können. Jeder Empfängermaus wurden $3-4 \times 10^6$ $CD8^+ CD62L^{high}$ Zellen injiziert.

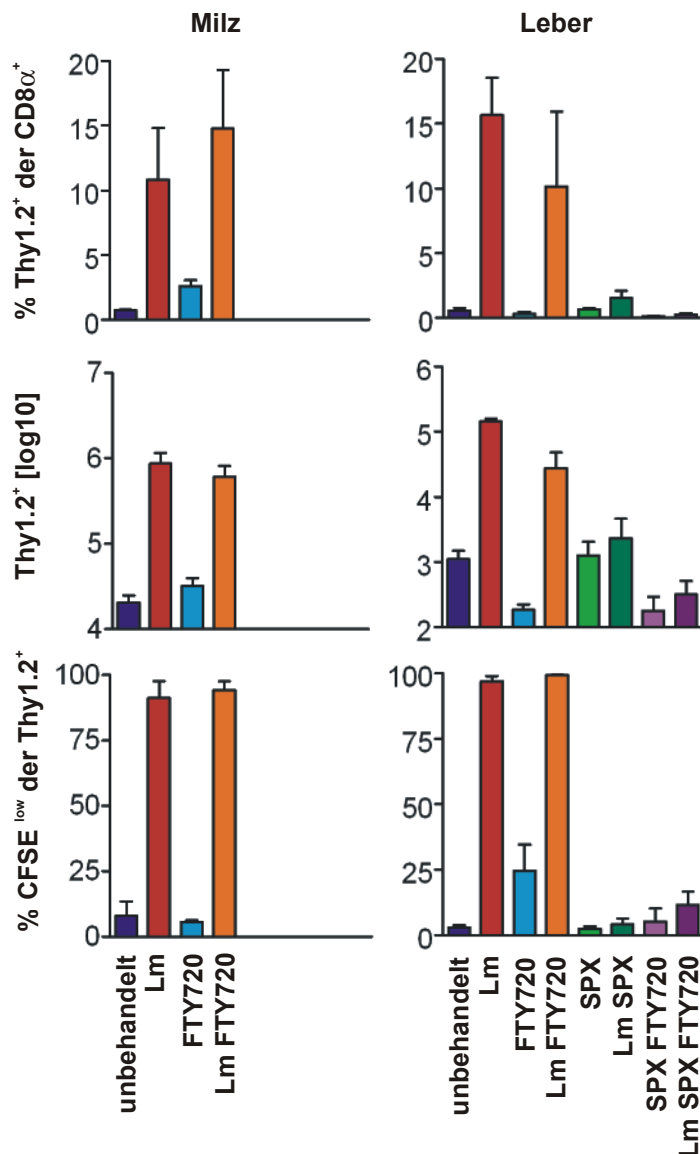


Abbildung 15: Primäre CD8⁺ T-Zell-Antwort gegen LmOVA in einem Transfermodell. Für Thy1.1 kongene C57BL/6 Mäuse wurden splenektomiert und FTY720-behandelt wie beschrieben. Die Mäuse wurden mit 1000 LmOVA infiziert oder naiv belassen. Einen Tag nach der Infektion erhielten alle Mäuse $3-4 \times 10^6$ aufgereinigte, naive CD8⁺ T-Zellen aus OT1 Mäusen. Die CD8⁺ T-Zellen wurden vor dem Transfer mit CFSE markiert. Drei Tage nach dem T-Zell-Transfer wurden die Lymphozyten aus Milz und Leber isoliert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Abbildung zeigt den Anteil der aus den OT1 Mäusen stammenden Thy1.2⁺ CD8α⁺ T-Zellen an den gesamten CD8α⁺ T-Zellen, die absoluten Zahlen der Thy1.2⁺ CD8α⁺ T-Zellen (log10-Skalierung) sowie die Frequenzen der CFSE^{low} Zellen innerhalb der Thy1.2⁺ CD8α⁺ T-Zellen. Die Balken geben Mittelwerte \pm SD von drei individuell analysierten Mäusen pro Gruppe an. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Die Infektion der Empfängertiere verursachte eine starke Proliferation der transferierten Zellen in Milz und Leber (Abbildung 15). Dieses wurde durch den Anstieg der Gesamtzahl der Thy1.2⁺ CD8⁺ T-Zellen und durch die Abnahme der CFSE-Intensität dieser Zellen am Tag drei nach der Infektion deutlich. Gemäß der verminderten CFSE-Floureszenz hatte sich die Mehrzahl der Thy1.2⁺ CD8⁺ T-Zellen mindestens dreimal geteilt (nicht gezeigte Daten). Hinsichtlich der Prozentsätze Thy1.2-positiver Zellen und der reduzierten CFSE Intensität,

hatte eine FTY720-Behandlung keinen Einfluss auf die Proliferation transferierter Zellen in Milz und Leber. Durch die Verminderung der gesamten $CD8^+$ T-Zellzahlen führte die FTY720-Behandlung aber zu einer Reduzierung der $Thy1.2^+ CD8^+$ T-Zellen in der Leber. Das Entfernen der Milz hingegen hatte eine deutlich geringere Proliferation der transferierten Zellen zur Folge. Nach Kombination von Splenektomie und FTY720-Behandlung war praktische keine Proliferation dieser Zellen mehr messbar.

4.2.4 Einfluss einer FTY720-Behandlung und Splenektomie auf die Sekundärantwort nach iv Infektion

Im Folgenden wurde der Einfluss einer FTY720-Behandlung in Kombination mit Splenektomie auf die Ausbildung einer Sekundärantwort untersucht. Mäuse wurden mit 5000 LmOVA Bakterien iv infiziert und drei Wochen nach der Infektion, als die Tiere die Infektion komplett überwunden und die Bakterien eliminiert hatten, wurden einer Gruppe von Mäusen die Milzen entnommen. Nach weiteren zwei Monaten wurden die Mäuse mit FTY720 im Trinkwasser behandelt und einen Tag später iv mit 10^5 LmOVA infiziert. Nach weiteren fünf Tagen wurden die T-Zell-Antworten in Milz und Leber analysiert. Die zweite Infektion erzeugte eine starke $OVA_{257-264}$ -spezifische $CD8^+$ T-Zell-Antwort in allen untersuchten Geweben (Abbildung 16). Bezogen auf die Frequenzen antigenspezifischer Zellen verminderte eine FTY720-Behandlung diese Antworten in der Milz nur leicht. In einigen Experimenten war auch in der Leber eine leicht geringere Frequenz antigenspezifischer Zellen zu beobachten (nicht gezeigte Daten). Aufgrund der T-Zell-depletierenden Wirkung von FTY720 war die Reduktion der absoluten Zahlen $OVA_{257-264}$ -spezifischer $CD8^+$ T-Zellen ausgeprägter. Das Entfernen der Milz verursachte sowohl als alleinige Maßnahme als auch in Kombination mit einer FTY720-Behandlung eine drastische Verminderung der Sekundärantwort fast bis auf das Hintergrundniveau in nicht sekundär infizierten Tieren (Abbildung 16). Dieses Zusammenbrechen der Sekundärantwort war nicht auf die Leber beschränkt, sondern konnte auch in den MLN beobachtet werden (nicht gezeigte Daten).

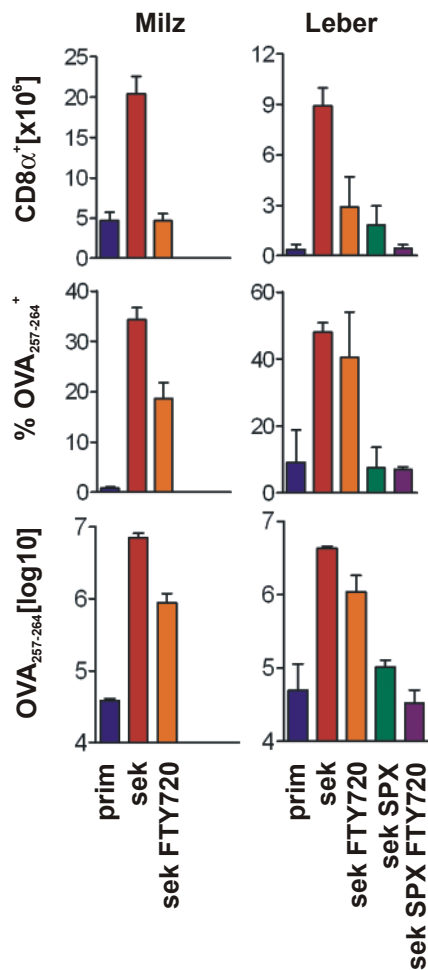


Abbildung 16: Sekundäre CD8⁺ T-Zell-Antwort nach iv Infektion von FTY720-behandelten und splenektomierten Mäusen. C57BL/6 Mäuse wurden mit 5×10^3 LmOVA infiziert. Drei Wochen nach der Infektion wurden die Mäuse splenektomiert (SPX). Nach weiteren zwei Monaten wurden die Mäuse mit 10^5 LmOVA sekundär infiziert (sek) oder blieben unbehandelt (prim). Entsprechend gekennzeichnete Gruppen von Mäusen erhielten 5 µg/ml FTY720 im Trinkwasser ab einem Tag vor der Sekundärinfektion (FTY720). Fünf Tage nach der Sekundärinfektion wurden die CD8⁺ T-Zell-Antworten mit Hilfe von OVA₂₅₇₋₂₆₄-Tetrameren analysiert. Die Abbildung zeigt die Gesamtzahl der CD8α⁺ T-Zellen pro Organ, die Prozentwerte der OVA₂₅₇₋₂₆₄-Tetramer⁺ CD62L^{low} Zellen innerhalb der CD8α⁺ T-Zellen und die absoluten Zahlen der OVA₂₅₇₋₂₆₄-Tetramer⁺ CD62L^{low} CD8α⁺ T-Zellen (log10-Skalierung). Die Balken zeigen Mittelwerte \pm SD von drei individuell analysierten Mäusen pro Gruppe. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Parallel zu der Untersuchung antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen mittels MHC-Klasse-I-Tetramer-Färbung wurde die IFN γ Produktion in CD4⁺ T-Zellen nach Inkubation mit LLO₁₉₀₋₂₀₁ untersucht (Abbildung 17). Nach FTY720-Behandlung waren die Frequenzen LLO₁₉₀₋₂₀₁-spezifischer CD4⁺ T-Zellen in Milz und Leber verglichen mit unbehandelten Tieren nur leicht reduziert. Der Hintergrund der IFN γ Produktion in der Leber war in diesem Experiment allerdings recht hoch. Aufgrund einer Verminderung der Gesamtzahlen an CD4⁺ T-Zellen waren die Zahlen antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen ebenfalls reduziert. Eine Splenektomie alleine führte ebenfalls zu einer Verringerung der Antwort, aber die Kombination mit einer FTY720-Behandlung hatte keinen zusätzlichen hemmenden Effekt.

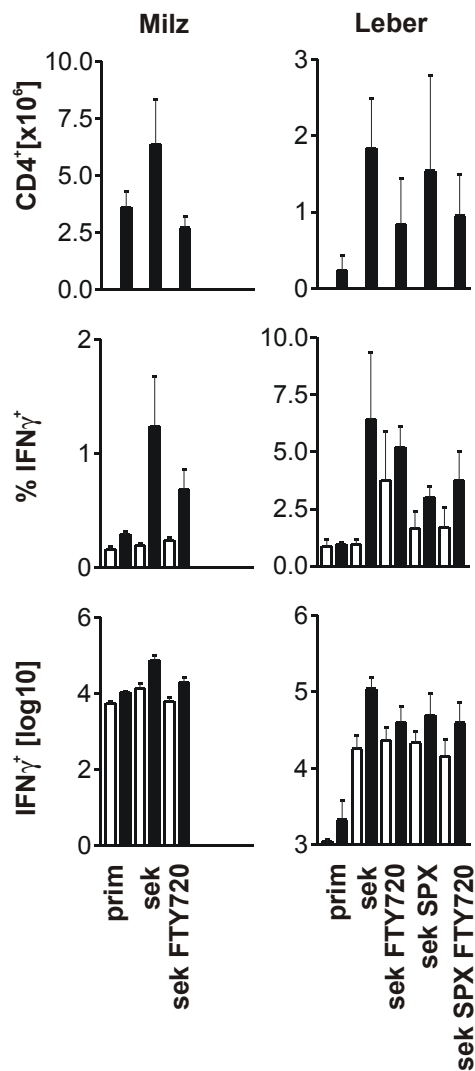


Abbildung 17: Sekundäre CD4⁺ T-Zell-Antwort nach iv Infektion von FTY720-behandelten und splenektomierten Mäusen. C57BL/6 Mäuse wurden mit 5×10^3 LmOVA infiziert. Drei Wochen nach Infektion wurden die Mäuse splenektomiert (SPX). Nach weiteren zwei Monaten wurden die Mäuse mit 10^5 LmOVA sekundär infiziert (sek) oder blieben unbehandelt (prim). Entsprechend gekennzeichnete Gruppen von Mäusen erhielten 5 mg/ml FTY720 im Trinkwasser ab einem Tag vor der Sekundärinfektion (FTY720). Fünf Tage nach der Sekundärinfektion wurden die Lymphozyten aus Milz und Leber isoliert und mit 10^{-6} M LLO₁₉₀₋₂₀₁ Peptid (■) oder ohne Peptid (□) inkubiert. Nach 5 h wurden die Zellen extrazellulär mit anti-CD4 mAk und intrazellulär mit anti-IFNγ mAk gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Abbildung zeigt die Gesamtzahl der CD4⁺ T-Zellen, die Prozentwerte der IFNγ⁺ Zellen innerhalb der CD4⁺ Zellen und die Gesamtzahl der IFNγ⁺ CD4⁺ Zellen (log10). Die Balken zeigen Mittelwerte \pm SD von drei individuell analysierten Mäusen pro Gruppe. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Da die Milz einen großen Anteil an Gedächtnis-Zellen enthält, könnten die schwächeren Sekundärantworten in splenektomierten Mäusen schlicht die geringere Anzahl an Gedächtnis-Zellen widerspiegeln, welche für die Initiierung einer Antwort zur Verfügung stehen.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde ein Transferversuch durchgeführt, in dem normale und splenektomierte Mäuse vor einer Infektion gleiche Mengen an Gedächtniszellen erhielten. Für Thy1.1⁺ kongene C57BL/6 Mäuse wurden mit 5×10^3 LmOVA infiziert. Nach zwei Monaten wurden Lymphozyten aus Milz, PLN und MLN isoliert und vereinigt. Die roten

Blutkörperchen wurden lysiert und die Zellen vor dem Transfer zweimal mit PBS gewaschen. Zellen, die pro Empfängertier der Anzahl nach dem Lymphozytengehalt einer halben Milz entsprachen wurden intravenös in naive Thy1.2⁺ C57BL/6 Rezipienten transferiert. Von den Rezipienten war eine Gruppe drei Wochen zuvor splenektomiert worden. Vier Stunden nach dem Zelltransfer wurden die Tiere mit 10^5 LmOVA infiziert. Nach weiteren fünf Tagen wurden die T-Zell-Antworten in Milz und Leber analysiert. Die Infektion der Rezipienten bewirkte eine signifikante Vergrößerung der transferierten Thy1.1⁺ CD8⁺ T-Zell-Population in Milz und Leber (Abbildung 18B). Sowohl in der Milz als auch in der Leber war ein großer Anteil dieser Zellen spezifisch für OVA₂₅₇₋₂₆₄.

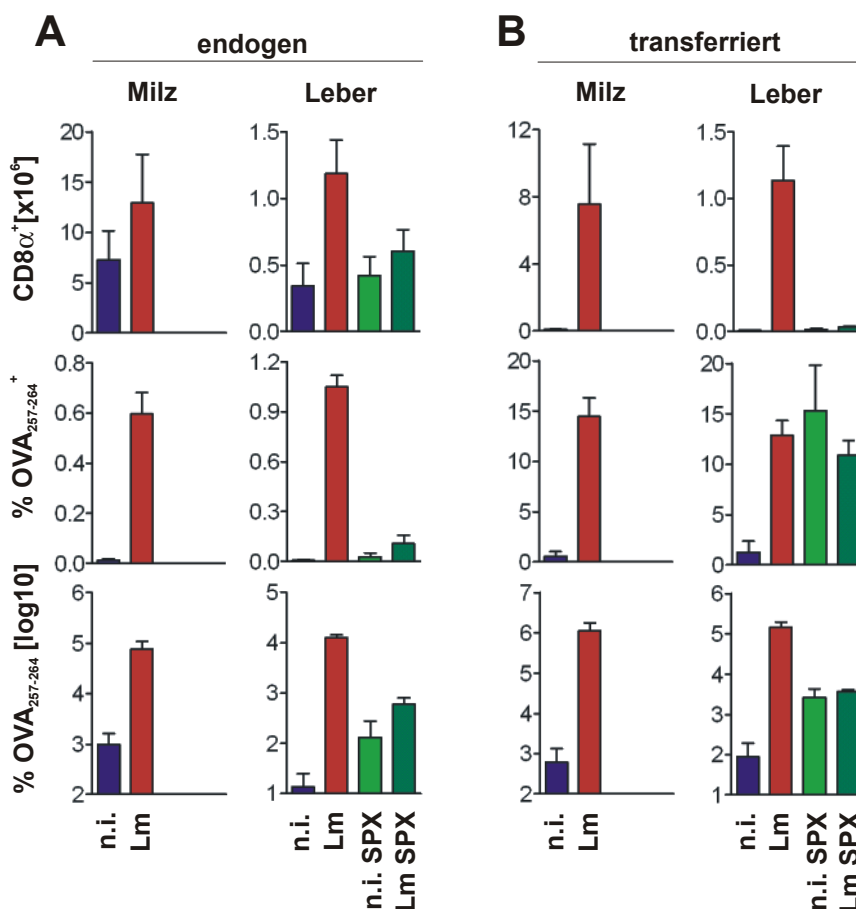


Abbildung 18: Sekundäre CD8⁺ T-Zell-Antwort nach T-Zell-Transfer. Für Thy1.1 kongene C57BL/6 Mäuse wurden mit 5×10^3 LmOVA infiziert. Zwei Monate später wurden Lymphozyten, der Menge nach einer halben Milz entsprechend, aus diesen Mäusen iv in naive Thy1.2⁺ C57BL/6 Mäuse transferiert. Von den Empfängern wurde eine Gruppe drei Wochen vor Transfer splenektomiert. Vier Stunden nach dem Transfer wurden die Empfänger mit 10^5 LmOVA infiziert oder blieben unbehandelt (n.i.). Fünf Tage später wurden die CD8⁺ T-Zell-Antworten in Milz und Leber mittels OVA₂₅₇₋₂₆₄-Tetrameren analysiert. (A) Endogene Thy1.1⁺ T-Zellen. (B) Transferierte Thy1.1⁺ T-Zellen. Die Graphen zeigen die Gesamtzahl der CD8⁺ T-Zellen pro Organ, die Prozentwerte der OVA₂₅₇₋₂₆₄-Tetramer⁺ CD62L^{low} Zellen innerhalb der CD8⁺ T-Zellen und die absoluten Zahlen der OVA₂₅₇₋₂₆₄-Tetramer⁺ CD62L^{low} CD8⁺ T-Zellen (log10-Skalierung). Die Balken zeigen Mittelwerte \pm SD von drei individuell analysierten Mäusen pro Gruppe. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Endogene (Thy1.2^+) $\text{OVA}_{257-264}$ -spezifische CD8^+ T-Zell-Antworten der Rezipienten konnten in Milz und Leber ebenfalls detektiert werden, wenn auch mit 10-20-fach geringeren Frequenzen und Zellzahlen (Abbildung 18A). Die Splenektomie der Rezipienten bewirkte eine Akkumulation $\text{OVA}_{257-264}$ -spezifischer CD8^+ Gedächtnis-T-Zellen in den Lebern dieser Mäuse. Diese Population vergrößerte sich nach Infektion der splenektomierten Rezipienten aber nicht. Ähnlich wie für die Primärantwort bereits beschrieben (Abbildung 14), konnte nur eine sehr niedrige endogene CD8^+ T-Zell-Antwort in den splenektomierten Tieren gemessen werden.

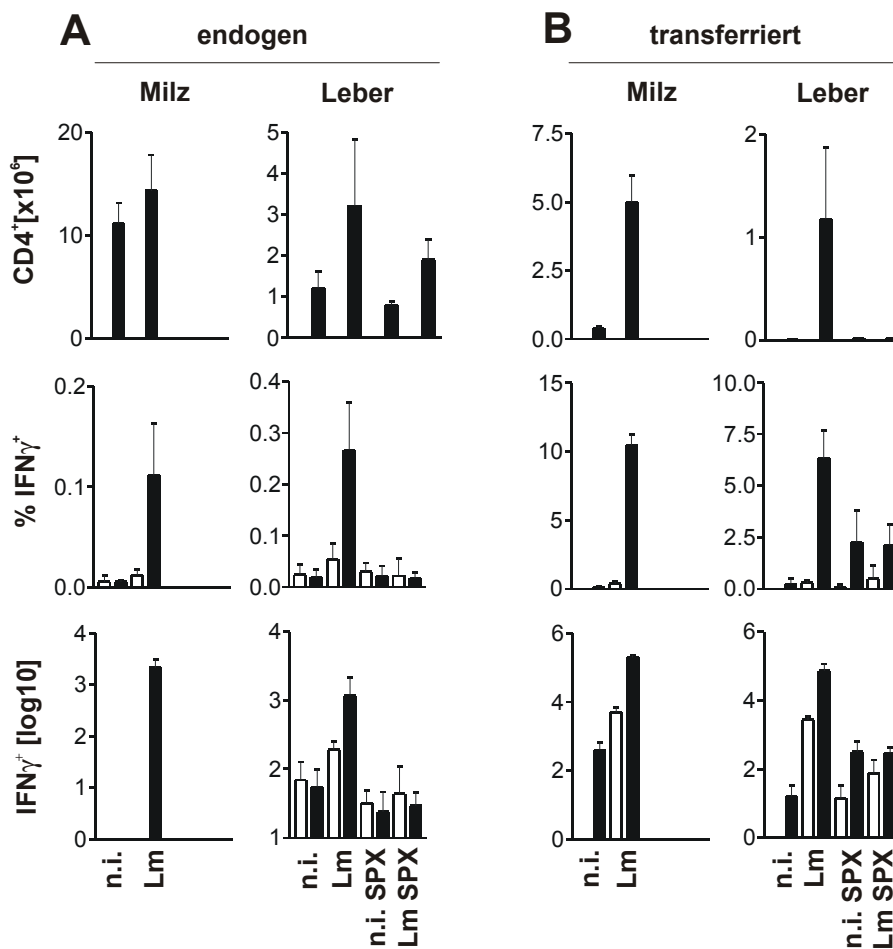


Abbildung 19: Sekundäre CD4^+ T-Zell-Antwort nach T-Zell-Transfer. Für Thy1.1 kongene C57BL/6 Mäuse wurden mit 5×10^3 LmOVA infiziert. Zwei Monate später wurden Lymphozyten, der Menge nach einer halben Milz entsprechend, aus diesen Mäusen iv in naive Thy1.2^+ C57BL/6 Mäuse transferiert. Von den Empfängern wurde eine Gruppe drei Wochen vor Transfer splenektomiert. Vier Stunden nach dem Transfer wurden die Empfänger mit 10^3 LmOVA infiziert oder blieben unbehandelt (n.i.). Fünf Tage nach der Infektion wurden die Lymphozyten aus Milz und Leber isoliert und mit 10^{-6}M $\text{LLO}_{190-201}$ -Peptid (■) oder ohne Peptid (□) inkubiert. Nach 5 h wurden die Zellen extrazellulär mit anti- CD4 mAk und intrazellulär mit anti- $\text{IFN}\gamma$ mAk gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. (A) Endogene Thy1.1 T-Zellen. (B) Transferierte Thy1.1^+ T-Zellen. Die Abbildung zeigt die Gesamtzahl der CD4^+ T-Zellen, die Prozentwerte der $\text{IFN}\gamma^+$ Zellen innerhalb der CD4^+ Zellen und die Gesamtzahl der $\text{IFN}\gamma^+$ CD4^+ Zellen ($\log 10$). Die Balken zeigen Mittelwerte \pm SD von drei individuell analysierten Mäusen pro Gruppe. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Die Analyse der IFN γ Produktion in CD4⁺ T-Zellen nach *in vitro* Restimulation mit LLO₁₉₀₋₂₀₁ ergab ein ähnliches Muster von Antworten (Abbildung 19). Die Infektion der Rezipienten hatte deutlich erhöhte Frequenzen und Zellzahlen IFN γ -produzierender Donor-T-Zellen zur Folge und eine schwache Antwort endogener T-Zellen. Die Splenektomie der Rezipienten führte zu einer Akkumulation antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen in der Leber. Die Frequenzen und absoluten Zellzahlen dieser Population stiegen aber nach einer Infektion der Rezipienten nicht an.

5 Diskussion

5.1 Charakterisierung mukosaler $CD8\alpha\beta^+$ T-Lymphozyten nach bakterieller Infektion

Nach Infektion mit LmOVA konnten aktivierte und OVA-spezifische $CD8\alpha\beta^+$ T-Zellen aus Milz, Leber und Dünndarmepithel der Maus isoliert und einem Transkriptomvergleich auf Oligonukleotidarrays unterzogen werden. Hierdurch konnte eine Anzahl von Genen identifiziert werden, die in den intraepithelialen $CD8\alpha\beta^+$ T-Zellen aus dem Darm eine deutlich andere Expressionsstärke als in entsprechenden Zellen aus den beiden Vergleichsorganen aufwiesen. Die Expression einer Gruppe von Proteinen, den NK-Rezeptoren, welche im Darm überwiegend herabreguliert waren, wurden in Laufe der vorliegenden Untersuchung mittels Durchflusszytometrie näher charakterisiert.

5.1.1 Aussagekraft des Transkriptomvergleichs

Zur Untersuchung unterschiedlicher Eigenschaften von systemischen T-Zellen und phänotypisch vergleichbaren T-Zell-Populationen gleicher Antigenspezifität in der Darmmukosa, konnten nach LmOVA-Infektion OVA-spezifische $CD62L^{low} CD8\alpha\beta^+$ T-Zellen aus IEL, Milz und Leber isoliert werden. Insgesamt wurden in vier unabhängigen Experimenten Transkriptomvergleiche von Zellen aus Milz und IEL auf Oligonukleotidarrays durchgeführt. In drei Fällen wurden parallel dazu auch Zellen aus Milz und Leber verglichen. Indirekt konnten so auch die Expressionsstärken zwischen Zellen aus Leber und IEL verglichen werden. Bei drei dieser Versuche wurde die RNA auf 8,4 K-Arrays mit potentiell immunrelevanten Genen hybridisiert. In einem dieser Versuche wurden nicht Zellen einer bestimmten Antigenspezifität verglichen, sondern alle $CD62L^{low} CD8\alpha\beta^+$ T-Zellen. In diesem Fall wurden nicht nur kürzlich TZR-abhängig aktivierte Zellen betrachtet, sondern die Population enthielt insbesondere im Darm auch Gedächtnis-T-Zellen. Das Einbeziehen dieses Vergleiches in die spätere Auswahl als reproduzierbar differentiell exprimiert angesehener Gene, kann einerseits zu dem Ausschluss von Genen führen, welche nur in kürzlich aktivierten Zellen im Dünndarm differentiell reguliert sind, andererseits erlaubt dieses Vorgehen eine Verallgemeinerung der Resultate dahingehend, dass der Phänotyp nicht nur für Zellen einer Antigenspezifität charakteristisch ist.

Die in Tabelle 3 angegebenen Zahlen an mindestens 2-fach unterschiedlich stark exprimierten Genen pro Experiment (238 bis zu 1233 für die IEL) sind wahrscheinlich höher als die tatsächlich in den antigenspezifischen $CD62L^{low} CD8\alpha\beta^+$ T-Zellen mindestens 2-fach differen-

tiell exprimierten Gene. Dieses ist schon aus Abbildung 3D ersichtlich. Bei zwei identischen Versuchen wurden zwar in den IEL eine annähernd gleiche Anzahl mehr als 2-fach unterschiedlich zu Milzzellen exprimierter Gene gefunden (250 und 238), nur gut die Hälfte davon, nämlich 133 Gene, waren aber in beiden Versuchen in gleicher Weise differentiell reguliert. Bei den in Tabelle 4 zusammengetragenen 31 Genen, die in allen vier Experimenten als in den IEL differentiell reguliert identifiziert wurden, können aber zufällige Schwankungen ausgeschlossen werden.

Ein weiterer Faktor, der bei der Beurteilung der Mikroarray-Ergebnisse in Betracht gezogen werden muss, ist eine mögliche Verunreinigung der sortierten CD62L^{low} CD8αβ⁺ T-Zellen mit anderen Zelltypen. Besonders in den IEL, die zwischen Epithelzellen sitzen und an diese adherieren, ist trotz magnetischer und durchflusszytometrischer Sortierung eine vollständige Eliminierung dieser Zellen nicht sicher. Bei Zellen aus Milz und Leber ist dagegen eine solche Verunreinigung eher unwahrscheinlich. Die in allen Experimenten in den IEL größere Anzahl unterschiedlich zu Milzzellen regulierter Gene (238 bis 615 auf dem 8,4 K-Array) als in der Leber (19 bis 160 auf dem 8,4 K-Array) kann daher einerseits in einer tatsächlich größeren Ähnlichkeit zwischen aus Milz und Leber isolierten T-Zellen resultieren, sie kann aber auch zum Teil eventuell auf Verunreinigungen der IEL mit Epithelzellen oder TZRγδ⁺ T-Zellen zurückzuführen sein. Hinweise auf solche Verunreinigungen liefern das in allen Experimenten unterschiedlich regulierte Gen T-Zell-Rezeptor Gamma Variable 4 sowie das Gen Cadherin 1 (E-Cadherin), welches auf dem 44 K-Array in den IEL stark heraufreguliert war. Hervorzuheben ist, dass selbst Kontaminationen von nur einem Prozent oder weniger unter Umständen die Analyseergebnisse deutlich verändern können. So ist es vorstellbar, dass in Epithelzellen oder sekretorischen Zellen im Darm bestimmte Gene durchaus 1000-fach stärker exprimiert werden als in T-Zellen.

Für die auf dem 44 K-Array als differentiell reguliert erscheinenden Sequenzen muss darauf hingewiesen werden, dass die Hybridisierung auf diesem gesamt-Mausgenom-Chip nicht wiederholt wurde. Hier identifizierte Gene sind also nur als mögliche Hinweise zu verstehen, die in jedem Fall einer Validierung bedürfen. Wie in Abbildung 4 und 5 deutlich wird, ist ein Großteil der auf dem 44 K-Array in den IEL herauf- oder herunterregulierter Gene mit Metabolismus und grundlegenden zellphysiologischen Prozessen assoziiert. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wäre, dass die T-Zellen in der Darmmukosa z.B. durch das sie umgebende Hormonmilieu beeinflusst werden und ihre metabolischen Prozesse der Umgebung anpassen. Wahrscheinlicher erscheint jedoch hier, dass zumindest ein großer Anteil dieser unterschiedlich abundanten Sequenzen auf Verunreinigungen mit Epithelzellen

zurückgeht. Diese sind auf die Aufnahme und den Transport von Nährstoffen spezialisiert. Dieser Zelltyp unterscheidet sich darüber hinaus naturgemäß in den physiologischen Prozessen und der Lebensdauer von T-Zellen, so dass ein Teil der hiermit assoziierten Gene hierdurch erklärbar wären. Nichtsdestotrotz waren in diesem Experiment auch eine Reihe von unterschiedlich regulierten Genen mit Immunantworten, Stressantworten und Migration von Zellen assoziiert. Die Heraufregulation des Integrins- αE in den IEL ist beschrieben (Kilshaw und Murant, 90; Ericsson *et al.*, 04) und wurde hier sowohl auf den 8,4 K als auch auf dem 44 K-Array gezeigt. Dieses Ergebnis zeigt, dass mit der vorliegenden Untersuchung gewebespezifische Expressionsunterschiede zwischen T-Zellen messbar sind.

Ein weiterer zu beachtender Punkt ist, dass nach Feststellung eines Expressionsunterschiedes auf mRNA Ebene noch der Nachweis einer tatsächlich unterschiedlichen Proteinabundanz in den Zellen zu führen ist. Für die in Rahmen dieser Arbeit untersuchten NKR konnte mittels Durchflusszytometrie ein Unterschied in der Oberflächenexpression dieser Proteine gezeigt werden.

5.1.2 Genexpressions-Unterschiede zwischen kürzlich aktivierten $CD8\alpha\beta^+$ T-Zellen aus Milz und Dünndarmepithel

Betrachtet man lediglich die 20 auf dem 44 K-Array am stärksten differentiell reguliert erscheinenden Gene, so finden sich einige Gene, die für eine weitere Untersuchung interessant sein könnten.

Für die beiden zu einer Genfamilie gehörenden Gene *pancreas-associated protein* (Pap, auch als Reg III- β bezeichnet) und *regenerating islet-derived 3 gamma* (Reg III- γ), welche fast 100-fach und 28-fach erhöht waren, ist eine starke Expression im gesamten Dünndarmgewebe beschrieben (Itoh und Teraoka, 93; Narushima *et al.*, 97). Die beiden Gene kodieren für sekretierte C-Typ-Lektine. Für Pap wurde eine antiinflammatorische Wirkung auf verschiedenen Zelltypen gezeigt (Vasseur *et al.*, 04). RegIII- γ wird von spezialisierten Epithelzellen im Darm sekretiert und für RegIII- γ sowie für humanes Pap1 wurde eine direkte antimikrobielle Wirkung nachgewiesen (Cash *et al.*, 06). Beide Gene könnten also wiederum aufgrund verunreinigender Epithelzellen in die Liste der in den IEL hochregulierten Gene gelangt sein. Sollten die Proteine aber tatsächlich auch von den T-Zellen im Darm exprimiert werden, wäre dies ein interessanter Sachverhalt.

Für das 24-fach heraufregulierte CTLA4 ist bekannt, dass es die T-Zell-Aktivierung hemmt. CXCL10, welches 21-fach heraufreguliert war, wirkt auf CXCR3 exprimierende Th1-Zellen chemotaktisch, während es die Einwanderung CCR3 exprimierender Th2-Zellen hemmt (Loetscher *et al.*, 01).

Auffällig war die Heraufregulierung der Expression mehrerer Regulatoren von G-Protein-Signalkaskaden (RGS-Proteine). Eine Gruppe G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, welche durch RGS-Proteine reguliert werden, sind die Chemokinrezeptoren. Für alle vier in den Transkriptomvergleichen in den IEL heraufregulierten RSG-Proteine (RGS1, RGS2, RGS10 und RGS16) ist eine Expression in Lymphozyten beschrieben (Reif und Cyster, 00; Beadling *et al.*, 99; Haller *et al.*, 02). Für RGS1, welches auf dem gesamt-Mausgenom-Array ca. 40-fach heraufreguliert erschien, wurde ein hemmender Effekt auf die Chemokin-induzierte Migration von B-Zellen beschrieben (Han *et al.*, 05). Eine veränderte RGS-Protein-Expression in mukosalen T-Zellen könnte also Einfluss auf das Migrationsverhalten dieser Zellen nehmen und möglicherweise eine Retention dieser Zellen im Darmepithel begünstigen. Die Expression der Chemokinrezeptoren selber war zwischen den T-Zellen aus der Milz und denen des Darmepithels weit weniger unterschiedlich. CCR9 war in den IEL leicht erhöht. CX3CR1 war leicht und CCR2 deutlicher herabreguliert.

Deutlich in den IEL heraufreguliert waren dagegen der Chemokin-(C-motif)-Ligand 1 (Lymphotactin), die Chemokin-(C-C motif)-Liganden 3 und 4, (MIP-1 α und MIP-1 β) sowie Interferon- γ . Für diese vier Zytokine ist bekannt, dass sie von aktivierten CD8⁺ T-Zellen sekretiert werden. Sie mediierten Typ-1 Immunantworten und wirken zumindest zum Teil chemotaktisch (Dorner *et al.*, 02).

Die verstärkte Expression des Prostaglandin-E-Rezeptors 4 (Subtyp EP4) sowie der beiden Gene *nuclear receptor subfamily 4 group A member 1* und 2 (NUR77 und NURR1), welche zur Familie der Steroid-Hormonrezeptoren gehören, liefert Hinweise darauf, dass die T-Zellen eventuell auf das spezielle Hormonmilieu im Darm reagieren. Möglich ist aber auch, dass die verstärkte Expression dieser Rezeptoren in den T-Zellen des Darmes auf einen gesteigerten Aktivierungsgrad der Zellen hinweist. NUR77 beispielsweise wird in unreifen Thymozyten und in reifen T-Zellen nach T-Zell-Rezeptor/CD28-Stimulation heraufreguliert. In unreifen Thymozyten wirkt dieser Transkriptionsfaktor proapoptotisch, in aktivierten T-Zellen, kann allerdings diese Wirkung unterbunden oder verzögert werden (Cunningham *et al.*, 06).

Auffällig ist, dass neben NUR77 noch sechs weitere der reproduzierbar in den IEL differentiell regulierten Gene mit dem MAP-Kinase-Signalweg assoziiert sind. Darunter befinden sich

vier *dual specificity* Phosphatasen, die hemmend auf die MAP-Kinase-Signaltransduktion wirken (Camps *et al.*, 00).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die differentielle Regulation mehrerer NKR näher untersucht. KLRG1, NKR-P1C, CD94, NKG2A, NKG2C, NKG2E und NKG2D erschienen im Transkriptomvergleich in den IEL herunterreguliert, die 2B4-Expression war in den IEL erhöht. In den folgenden Abschnitten werden die Eigenschaften dieser Rezeptoren und anschließend die im Rahmen dieser Arbeit zu diesen Rezeptoren gemachten Beobachtungen näher diskutiert.

5.1.3 NK-Rezeptor Expression auf aktivierten CD8 $\alpha\beta$ ⁺ T-Zellen

NKR wurden zuerst auf NK-Zellen entdeckt und beschrieben. Mittlerweile wurde ihre Expression aber auch auf weiteren Zelltypen, unter anderem auch auf T-Zellen, beschrieben. Im Folgenden wird ein Überblick über die Expression und Funktion der hier näher untersuchten Rezeptoren auf NK-Zellen und CD8 $\alpha\beta$ ⁺ T-Zellen gegeben.

5.1.3.1 NKG2D

Der NKG2D-Rezeptor ist ein Beispiel für die Erkennung von selbst-Molekülen auf Tumorzellen und auf infizierten oder gestressten Zellen. NKG2D ist ein homodimerer Transmembranrezeptor mit Ähnlichkeit zu C-Typ-Lektinen. Er erkennt mehrere Oberflächenmoleküle, die entfernt mit MHC-Klasse-I Molekülen verwandt sind. Beim Menschen sind die Liganden MICA, MICB, ULBP1, ULBP2 und ULBP4 bekannt (Bauer *et al.*, 99; Cosman *et al.*, 01; Jan *et al.*, 03). In der Maus wurden die Liganden RAE-1 α , RAE-1 β , RAE-1 γ , RAE-1 δ , RAE-1 ϵ , H60 und MULT1 identifiziert (Diefenbach *et al.*, 01; Cerwenka *et al.*, 01; Carayannopoulos *et al.*, 02; Diefenbach *et al.*, 03). Die Expression dieser Liganden auf gesunden Zellen ist, wenn überhaupt vorhanden, nur sehr gering. In gestressten Zellen und unter pathologischen Bedingungen wird ihre Expression jedoch induziert (Hamerman *et al.*, 04; Gasser *et al.*, 05; Borchers *et al.*, 06).

In Mensch und Maus ist NKG2D auf fast allen NK-Zellen zu finden. Die Expression in CD8⁺ T-Zellen unterscheidet sich jedoch zwischen den beiden Spezies. Im Menschen wird NKG2D in CD8⁺ T-Zellen des peripheren Blutes konstitutiv exprimiert (Bauer *et al.*, 99), also schon in naiven Zellen. In der Maus dagegen wird der Rezeptor erst nach Aktivierung der Zellen exprimiert (Jamieson *et al.*, 02).

Ein weiterer Unterschied zwischen Mensch und Maus besteht in der Expression zweier Splice-Varianten, die unterschiedliche Adaptor-Proteine (DAP12 und DAP10) binden. DAP12 enthält ein *immunoreceptor tyrosin-based activation motif* (ITAM), während DAP10

stattdessen ein Tyrosin-basierendes Motiv enthält, welches in kostimulatorischen Rezeptoren wie CD28 und ICOS zu finden ist (Wu *et al.*, 99; Chang *et al.*, 99). Im Menschen wird nur die Variante exprimiert, die exklusiv mit DAP10 assoziiert (Wu *et al.*, 99). In der Maus werden beide Varianten exprimiert (Diefenbach *et al.*, 02; Gilfillan *et al.*, 02). Allerdings wird in den CD8⁺ T-Zellen der Maus normalerweise nur DAP10 exprimiert, sodass hier wie im Menschen nur der DAP10-vermittelte-Signalweg offensteht (Diefenbach *et al.*, 02; Gilfillan *et al.*, 02).

NKG2D ist ein aktivierender Rezeptor. Bislang gibt es keine Hinweise darauf, dass die verschiedenen Liganden zu verschiedenen biologischen Effekten führen. Unterschiede in der Auswirkung einer Rezeptor-Stimulation bestehen aber zwischen NK- und T-Zellen. Die Stimulation von NKG2D auf NK-Zellen kann direkt das zellvermittelte Töten Virus-infizierter oder transformierter Zellen auslösen (Karre *et al.*, 86; Cosman *et al.*, 01). In T-Zellen dagegen ist für NKG2D vorwiegend eine kostimulierende Wirkung beschrieben (Jamieson *et al.*, 02; Groh *et al.*, 01; Maasho *et al.*, 05; Markiewicz *et al.*, 05; Rausch *et al.*, 06). Einem anderen Bericht zufolge führt eine NKG2D-Stimulation unter vielen Bedingungen jedoch nicht einmal zu einer Kostimulation der CD8⁺ T-Zellen (Ehrlich *et al.*, 05).

Neuere Studien deuten an, dass die NKG2D-Expression auf T-Zellen in die Entwicklung von Autoimmunkrankheiten involviert ist. So wurde in einem Mausstamm, der spontan einen Insulin-abhängigen Diabetes Mellitus entwickelt, die Expression von RAE-1 Proteinen in prädiabetischen Inselzellen beobachtet. Die autoreaktiven CD8⁺ T-Zellen, welche die Bauchspeicheldrüse infiltrierten, exprimierten NKG2D. Eine nicht-depletierende Behandlung mit anti-NKG2D mAb in der prädiabetischen Phase verhinderte den Ausbruch der Krankheit durch eine Behinderung der Proliferation und Funktion autoreaktiver CD8⁺ T-Zellen. (Ogasawara *et al.*, 04). Bei Patienten mit Zöliakie wurde die Überexpression von MICA im Darmgewebe festgestellt. Es wird vermutet, dass durch IL-15 aktivierte NKG2D-exprimierende zytotoxische CD8⁺ T-Lymphozyten MICA-tragende Gewebe mitunter sogar TZR-unabhängig angreifen (Hue *et al.*, 04; Meresse *et al.*, 04; Roberts *et al.*, 01), und dass sie dadurch diese Gewebe erheblich schädigen können.

5.1.3.2 NKG2/CD94 Rezeptoren

NKG2/CD94 Rezeptoren werden auf den meisten NK-Zellen und auf Teilpopulationen von Effektor- und Gedächtnis-CD8 $\alpha\beta$ ⁺ T-Zellen exprimiert (Slifka *et al.*, 00). NKG2/CD94 Rezeptoren erkennen nicht-konventionelle MHC-Klasse-Ib-Moleküle als Liganden (HLA-E im Menschen und Qa1^b in der Maus). Die am häufigsten von diesen MHC-Klasse-Ib Molekülen gebundenen Peptide entstammen den Leitsequenzen anderer MHC-Klasse-I-Proteine (Borrego *et al.*, 98; Aldrich *et al.*, 94; Braud *et al.*, 97; Lee *et al.*, 98). Daher können

NKG2/CD94 Rezeptoren die Abundanz der klassischen und bestimmter nicht-konventioneller MHC-Klasse-I-Moleküle erkennen.

Im Menschen gehören NKG2A, -C, -E, und -F zu dieser Rezeptorfamilie, in der Maus wurden nur NKG2A, -C, und -E identifiziert (Houchins *et al.*, 91; Lohwasser *et al.*, 99; Vance *et al.*, 99). CD94 und die NKG2-Proteine sind C-Typ-Lektin-ähnliche Transmembranproteine. CD94 kann als Homodimer oder als Heterodimer mit NKG2A oder NKG2C auf der Zelloberfläche exprimiert werden (Vance *et al.*, 99; Lazetic *et al.*, 96; Brooks *et al.*, 97). CD94 Homodimere binden aber weder HLA-E noch Qa1^b (Vance *et al.*, 99; Lazetic *et al.*, 96). Außerdem haben sie keine zytoplasmatische Domäne, sodass eine Signaltransduktion durch diesen Rezeptor unwahrscheinlich ist. NKG2A hat ein *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* (ITIM) in seiner zytoplasmatischen Domäne und NKG2A/CD94 Heterodimere fungieren als inhibitorische Rezeptoren (Houchins *et al.*, 97). NKG2C/CD94 und NKG2E/CD94 dagegen assoziieren in NK-Zellen der Maus möglicherweise mit dem Signalmolekül DAP12 und fungieren als aktivierende Rezeptoren (Lanier *et al.*, 98; Vance *et al.*, 99). In Maus-T-Zellen, welche normalerweise kein DAP12 exprimieren ist bislang unklar, wie NKG2C/CD94- und NKG2E/CD94-Signale in der Zelle weitergeleitet werden. Berichte nach denen NKG2C/CD94 unter Umständen zu einer TZR-unabhängigen Aktivität von T-Zellen führen kann und in die Entwicklung von Autoimmunkrankheiten involviert ist (Guma *et al.*, 05; Meresse *et al.*, 06), sind daher nicht so leicht auf das murine System zu übertragen. Byers *et al* berichten, dass nach Polyoma-Virus-Infektion in den T-Zellen der Maus überwiegend NKG2A exprimiert wird (Byers *et al.*, 06). Virus-spezifische Zellen, die mit dem auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten anti-NKG2A/C/E mAb angefärbt wurden, waren dort zu ~90 % NKG2A⁺. Ähnliches wurde nach LCMV-Infektion beschrieben (McMahon *et al.*, 02). Für murine T-Zellen, die nach Virus-Infektion den NKG2A/CD94-Rezeptor exprimierten, konnten von verschiedenen Arbeitsgruppen keine durch diesen Rezeptor vermittelte Inhibition der CTL-Effektor-Funktionen dieser Zellen nachgewiesen werden (McMahon *et al.*, 02; Miller *et al.*, 02). Andere Gruppen beschreiben allerdings eine Inhibition der T-Zell-Zytotoxizität durch NKG2A/CD94 nach Virus-Infektionen (Moser *et al.*, 02; Suvas *et al.*, 06).

In dem hier durchgeführten Transkriptomvergleich aktivierter CD8αβ⁺ T-Zellen nach LmOVA-Infektion waren die mRNA für alle drei NKG2-Rezeptoren in den IEL herabreguliert. Eine funktionelle Auswirkung dieser unterschiedlichen Rezeptor-Expression auf die murinen T-Zellen ist, wenn überhaupt, nur für NKG2A/CD94 wahrscheinlich.

5.1.3.3 KLRG1

Der *killer cell lectin-like receptor G1* (KLRG1), früher auch *mast cell function-associated antigen* (MAFA) genannt, ist ein Lektin-ähnlicher Transmembranrezeptor, der ein zytoplasmatisches ITIM Motif besitzt (Guthmann *et al.*, 95; Hanke *et al.*, 98; Blaser *et al.*, 98). Der Rezeptor wird auf NK-Zellen und Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen exprimiert. Als Liganden wurden kürzlich E-, N- und R-Cadherin identifiziert (Ito *et al.*, 06; Grundemann *et al.*, 06). Grundemann *et al.* haben beschrieben, dass die Expression von E-Cadherin auf APCs die Antigen-induzierte Proliferation und die Induktion der zytolytischen Aktivität von KLRG1⁺ CD8⁺ T-Zellen inhibiert, nicht jedoch die Zell-vermittelte Lyse durch bereits aktivierte KLRG1⁺ Effektor-T-Zellen. Einem Bericht von Voeringer *et al.* zur Folge sind KLRG1⁺ T-Zellen in ihrer Fähigkeit zur Proliferation nach Antigenkontakt stark eingeschränkt (Voehringer *et al.*, 01).

5.1.3.4 Hat die niedrigere NKR-Expression auf CD8αβ⁺ T-Zellen im Darmepithel funktionale Konsequenzen?

Der Nachweis, dass die geringere NKR-Expression auf konventionellen IEL CD8αβ⁺ T-Zellen zu einer veränderten Aktivität gegenüber Liganden-exprimierenden Zielzellen führt, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht erbracht und steht noch aus. Das Dünndarmepithel exprimiert schon im gesunden Zustand einige NKR-Liganden. Die oben aufgeführten Beispiele für eine pathologische Wirkung einer erhöhten Expression des aktivierenden NKRs NKG2D auf CD8⁺ T-Zellen im Darm legen nahe, dass durch die Herabregulation dieses Rezeptors im Darm eine unerwünschte Schädigung des Gewebes vermieden wird. Die Herabregulation inhibitorischer Rezeptoren wie KLRG1 und NKG2A/CD94 ist funktionell schwieriger zu erklären. Möglich ist, dass zumindest für KLRG1 die permanente Stimulation mit dem von den Epithelzellen konstitutiv exprimierten Liganden E-Cadherin zu stark inhibitorisch auf die T-Zellen wirken würde. Möglich ist für KLRG1 auch, dass die Expression dieses Rezeptors in den IEL mit der Interaktion zwischen dem Integrin-αEβ7 auf den T-Zellen und E-Cadherin auf den Epithelzellen interferiert. Denkbar sind hier sowohl eine Kompetetion um Bindungsstellen oder eine sterische Behinderung von Bindungsstellen, als auch eine Veränderung der Integrin-Bindungsaffinität durch KLRG1. Dieses könnte Auswirkungen auf die Migration der T-Zellen in das Epithel bzw. auf ihre Fähigkeit zur Retention im Epithel haben.

5.1.3.5 Werden die NKR nach Eintritt in das intestinale Epithel herabreguliert, oder migrieren präferentiell NKR-negative Zellen in das Darmgewebe?

Unklar ist, ob die niedrigere Expression der NKR in den IEL eine Folge der bevorzugten Migration NKR-negativer Zellen in den Darm ist, oder ob das Darmmilieu eine Herabregulation der Rezeptoren bewirkt. Ein Versuch, diese Fragestellung durch Transfer NKR-positiver Zellen in Thy1.1 kongene Mäuse zu bearbeiten, führte zu keinen belastbaren Resultaten. Es konnten zuwenig transferierte Zellen aus den IEL wiedergewonnen werden, um über eine Herabregulation oder konstante Expression der Rezeptoren in den IEL zu urteilen (Daten nicht gezeigt). Dieser Ansatz erlaubte außerdem keine Diskriminierung zwischen schon einige Tage in den IEL befindlichen und kürzlich eingewanderten Zellen, welche möglicherweise für eine Gewebe-induzierte Herabregulation den entsprechenden Faktoren zu kurz ausgesetzt waren.

Hinweise auf den vorherrschenden Mechanismus könnte aber die Analyse der Auswirkung verschiedener Infektionsrouten auf die NKR-Expression auf den $CD8\alpha\beta^+$ T-Zellen des Darmepithels geben. Die Beobachtung, dass nach iv Infektion die NKR-Expression auf den IEL höher ist, als nach ig Infektion, sowie die in den MLN im Vergleich zur Milz etwas geringfügigere NKR-Expression, lassen zwei verschiedene, sich aber nicht ausschließende Mechanismen vermuten. Eine Aktivierung von T-Zellen im GALT könnte erstens dazu führen, dass mehr T-Zellen zu einem früheren Zeitpunkt in das Darmepithel einwandern, als dies nach iv Infektion der Fall ist. Außerdem haben bei Verwendung dieser Infektionsroute mehr T-Zellen einen Phänotyp, der ihnen die Akkumulation im Darmgewebe ermöglicht (Mora *et al.*, 03; Johansson-Lindbom *et al.*, 03; Iwata *et al.*, 04). Damit wären nach ig Infektion mehr T-Zellen deutlich länger den Einflüssen des Epithels ausgesetzt, als nach iv Infektion. Diese Theorie spräche für eine Herabregulation der NKR nach Eintritt in das Epithel. Eine zweite Möglichkeit ist, dass bei einer Aktivierung im MALT insbesondere auf Zellen, die mit einem Darm-trophischen Phänotyp ausgestattet werden, eine geringere Expression von NKR induziert wird.

Mögliche Ursachen für eine Herabregulation der Rezeptoren nach Eintritt in das Darmepithel werden in den folgenden beiden Abschnitten diskutiert.

5.1.3.6 Einfluss der Darmflora auf die NKR-Expression

Bei der Suche nach unterschiedlichen Einflüssen auf die T-Zellen in Milz und intestinalem Epithel liegt es nahe, einen Einfluss der Bakterienflora im Darm auf die NKR-Expression zu vermuten. Berichte über Liganden-induzierte Herabregulation von NKR sowie die Induktion

von NKR-Liganden durch LPS (Groh *et al.*, 02; Wiemann *et al.*, 05; Oppenheim *et al.*, 05; Hamerman *et al.*, 04) bieten darüber hinaus einen Ansatz zur Erklärung eines solchen Einflusses.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit keimfreien Mäusen sprechen aber gegen einen größeren Einfluss der Darmflora auf die niedrigere Expression der NKR in den IEL. Sowohl in naiven Tieren als auch nach ig LmOVA-Infektion wurde auch in den keimfreien Tieren eine deutlich verringerte NKR-Expression in den $CD8\alpha\beta^+$ T-Zellen des Darmes gegenüber denen in der Milz festgestellt. Für einige Rezeptoren war der Unterschied in den keimfreien Tieren jedoch geringer als in SPF Tieren, sodass ein partieller Einfluss der Darmflora auf die Herabregulation möglich ist.

Ein interessantes Ergebnis dieser Untersuchungen war, dass in naiven keimfreien Tieren die NKR-Expression auf $CD62L^{\text{low}}$ $CD8\alpha\beta^+$ Zellen aller untersuchten Organe deutlich geringer war als auf entsprechenden Zellen aus naiven SPF-Tieren. Dieses spiegelt den geringeren Aktivierungsgrad der Zellen wieder. Die NKR-Expression kann daher neben der $CD62L$ -Herabregulation als Indikator einer T-Zell-Aktivierung dienen.

5.1.3.7 Einfluss von Zytokinen auf die gewebespezifische NKR-Expression

Als andere Ursache für die geringe NKR-Expression auf IEL T-Zellen sind lösliche Faktoren, die von Epithelzellen oder regulatorischen Zellen im Darm sekretiert werden, denkbar. So ist bekannt, dass im Darm größere Mengen $TGF\beta$ produziert werden (Koyama und Podolsky, 89). Für dieses Zytokin wurde beschrieben, dass es die Oberflächenpräsenz von NKG2D auf NK- und T-Zellen verringern kann (Castriconi *et al.*, 03; Lee *et al.*, 04a). Hier durchgeführte Versuche mit $CD4^{dn}TGF\beta RII$ -transgenen Mäusen, deren T-Zellen $TGF\beta$ -Signale nur sehr eingeschränkt wahrnehmen können, zeigen, dass sowohl in naiven Tieren als auch nach ig LmOVA-Infektion die Differenz zwischen der NKR-Expression auf aktivierten $CD8^+$ T-Zellen im Darmepithel und denen in der Milz deutlich geringer ist als in wt Kontrolltieren. In naiven Tieren war zwischen der NKR-Expression auf $CD8^+$ T-Zellen aus dem Darm und Zellen aus der Milz auch in den transgenen Mäusen noch ein Unterschied messbar, aber dieser war wesentlich geringer als bei wt Tieren. Wurden nach Infektion nur die OVA-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen verglichen, so war kaum ein Unterschied zwischen der NKR-Expression in den IEL und in den übrigen analysierten Organen nachweisbar. Neben einer direkten Auswirkung der fehlenden bzw. stark verminderten $TGF\beta$ -Signaltransduktion auf die T-Zellen, könnte dieses Phänomen, insbesondere nach einer Infektion, auch indirekt durch eine verstärkte Entzündungsreaktion des Epithels und die nachfolgende Infiltration mit T-

Zellen aus der Peripherie begründet sein. Eine solche Infiltration ist für diese transgenen Mäuse beschrieben (Gorelik und Flavell, 00). In den hier durchgeführten Versuchen wurden allerdings möglichst junge Tiere verwendet, bei denen der Grad dieser Infiltration noch moderat sein sollte.

Auffallend ist, dass in den transgenen Tieren auch die Rezeptoren NKG2A/C/E verstärkt exprimiert wurden. Zumindest für NKG2A/CD94 wurde beschrieben, dass dessen Expression durch TGF β Signale induziert und nicht etwa gehemmt wird (Gunturi *et al.*, 05; Suvas *et al.*, 06). Daher müsste die hier implizierte Hemmung dieser Rezeptorengruppe durch TGF β eine Herabregulation von NKG2C/CD94 und NKG2E/CD94 Rezeptoren bedeuten. Dies wiederum stünde im Widerspruch zu der in Abschnitt 5.1.3.2 gemachten Annahme, dass ein Großteil der NKG2A/C/E-Färbung auf die Expression von NKG2A zurückgeht.

Insgesamt bekräftigen die in diesem Versuch erhaltenen Ergebnisse aber die Hypothese, dass TGF β maßgeblich an einer Herabregulation der NKR-Expression auf CD8⁺ T-Zellen im intestinalen Epithel verantwortlich ist. Gleichzeitig zeigen sie aber auch, dass TGF β hierfür nicht der einzige regulatorische Faktor ist. Die hier untersuchten NKR-Rezeptoren binden verschiedene Liganden, sind sowohl inhibitorischer als auch aktivierender Natur und werden unter verschiedenen Bedingungen in CD8⁺ T-Zellen herauf- oder herabreguliert. Daher scheint es am plausibelsten, dass jeder dieser Rezeptoren durch eine ganz bestimmte Kombination von Faktoren im Darm herabreguliert wird, die sich zwar überlappen können, aber nicht identisch sein müssen. Denkbar ist eine Kombination aus Liganden-Bindung-induzierter Herabregulation und Zytokin-vermittelter Regulation, wobei neben TGF β noch weitere Botenstoffe involviert sein können.

5.1.3.8 Relevanz für den Menschen?

Eine nicht unwichtige Frage ist die, ob die im murinen System gemachte Beobachtung der verminderten NKR-Expression im Darmepithel auf das humane System übertragbar ist. In der Literatur finden sich sowohl Hinweise auf eine verminderte NKR-Expression in humanen IEL (Roberts *et al.*, 01) als auch auf eine sogar erhöhte NKR-Expression (Meresse *et al.*, 06; Jabri *et al.*, 00). Eine intensivere Untersuchung dieses Sachverhaltes mag insbesondere aufgrund der Implikation einer erhöhten NKG2D und NKG2C Expression in die Pathologie der Zöliakie (Hue *et al.*, 04; Meresse *et al.*, 04; Meresse *et al.*, 06) interessant sein.

5.2 Untersuchung der Kapazität von Leber- und Darmgewebe zur Induktion primärer und sekundärer T-Zell-Antworten gegen *Listeria monocytogenes*

Unter Verwendung von Mäusen, die mit der immunmodulierenden Substanz FTY720 behandelt und/oder splenektomiert wurden, wurde die Induktion von T-Zell-Antworten nach primärer und sekundärer LmOVA-Infektion untersucht. Ziel war es, zu klären, ob nach einer Listerien-Infektion eine T-Zell-Aktivierung außerhalb sekundärer lymphoider Organe, z.B. in der Leber oder dem Darmgewebe, stattfinden kann.

5.2.1 Auswirkung der FTY720-Behandlung auf die T-Zell-Populationen in verschiedenen Organen

Die Substanz FTY720 lässt zwar eine Aktivierung der T-Zellen zu, behindert aber das Auswandern der Lymphozyten aus den Lymphknoten (Brinkmann *et al.*, 04; Pinschewer *et al.*, 00; Habicht *et al.*, 06). Eine Behandlung von Mäusen mit FTY720 reduzierte die Anzahl der CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen in der Milz und in der Leber. Diese Beobachtung ist dadurch erklärbar, dass einerseits das Auswandern von naiven T-Zellen aus dem Thymus blockiert wird und andererseits sowohl naive als auch gerade aktivierte T-Zellen in den Lymphknoten zurückgehalten werden (Brinkmann *et al.*, 04; Morris *et al.*, 05; Cose *et al.*, 06). Das in einigen Experimenten beobachtete Ansteigen der T-Zellzahlen in den MLN (nicht gezeigte Daten) steht in Übereinstimmung mit dem oben skizzierten Wirkmechanismus. Allerdings wurde zumindest für naive Mäuse auch beschrieben, dass in den MLN die T-Zell-Akkumulation geringer ist als in den PLN (Morris *et al.*, 05). Dass in den IEL die Gesamtzahl der T-Zellen durch FTY720 nur geringfügig beeinflusst wurde, könnte damit erklärt werden, dass die dort residenten T-Zellen insgesamt weit weniger stark rezirkulieren als T-Zellen aus z.B. der Milz oder der Leber.

5.2.2 Primäre T-Zell-Antwort in FTY720-behandelten und/oder splenektomierten Mäusen

Die FTY720-Behandlung der Tiere erlaubte die Generation LmOVA-spezifischer CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen. Auch eine IFN γ -Produktion und somit Effektor-Funktion dieser antigenspezifischen T-Zellen konnte nachgewiesen werden (nicht gezeigt für CD8⁺ T-Zellen). In den MLN und der Darmmukosa wurden die Frequenzen und die Anzahl LmOVA-spezifischer T-Zellen durch eine FTY720-Behandlung nicht verändert. In der Milz und der Leber bewirkte die FTY720-Gabe eine ca. 10-fache Reduktion der antigenspezifischen T-Zellen nach

LmOVA-Infektion. Nach dem Transfer naiver OT1-Zellen in anschließend mit LmOVA infizierte Mäuse war die Proliferation dieser Zellen in Milz und Leber FTY720-behandelter und unbehandelter Tiere annähernd gleich. Die FTY720-Behandlung alleine hatte also nur einen sehr moderaten Einfluss auf das Erscheinen antigenspezifischer T-Zellen in peripheren Geweben nach Listerien-Infektion. Diese Beobachtungen stehen im Kontrast zu Berichten, nach denen FTY720 unerwünschte T-Zell-Antworten nach Organtransplantationen oder in Autoimmunreaktionen wirksam unterbindet oder zumindest stark einschränkt (Brinkmann, 04). Möglich ist, dass durch die systemische Ausbreitung der Listerien und durch die Infektion verschiedener Zelltypen in unterschiedlichen lymphoiden und nicht-lymphoiden Geweben der Effekt des FTY720 weniger zum Tragen kommen kann. Nach Transplantationen oder in Autoimmunmodellen ist dagegen das T-Zell-Priming wahrscheinlich nur auf wenige drainierende Lymphknoten beschränkt. In einer solchen Situation kann FTY720 die Migration aktivierter T-Zellen in das Transplantat oder an Orte potentieller Autoimmun-Pathologie eventuell besser verhindern. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass FTY720 auch das Migrationsverhalten von aktivierten dendritischen Zellen aus peripheren Geweben in die drainierenden Lymphknoten verändert (Czeloth *et al.*, 05). Hierdurch kann die Wahrscheinlichkeit eines Kontaktes der T-Zellen mit Transplantatantigenen oder mit Autoantigenen, die eine gewebespezifische Expression haben, vermindert werden. Lm infiziert dagegen direkt Organe, in denen die T-Zell-Aktivierung stattfindet. Daher wird die T-Zell-Antwort gegen diesen Organismus durch FTY720 möglicherweise weniger stark behindert.

Die lediglich mit FTY720 behandelten Tiere hatten noch die Milz als sekundäres Organ, in dem eine T-Zell-Aktivierung stattfinden konnte und aus dem eine Auswanderung in andere Gewebe trotz der Behandlung möglich war. In Tieren, die sowohl FTY720 bekamen, als auch splenektomiert waren, sollten dagegen kaum antigenspezifische T-Zellen in nicht lymphoiden Organen gefunden werden. Dieses war nach iv Infektion mit geringen Listerien-Dosen der Fall. Auch in einem Transferversuch, der eine äquivalente Anzahl naiver OVA-spezifischer T-Zellen in der Peripherie in unbehandelten und mit FTY720 behandelten Tieren gewährleisten sollte, waren in den zusätzlich splenektomierten Tieren die T-Zell-Antworten gegen LmOVA in der Leber unterdrückt. Nach Infektion mit höheren Listerien-Dosen und nach oraler Infektion waren dagegen auch in zusätzlich zur FTY720-Behandlung splenektomierten Tieren deutliche T-Zell-Antworten in nicht-lymphoiden Organen messbar. Nach iv Infektion mit 5×10^3 LmOVA waren die T-Zell-Antworten in der Leber dieser Tiere zwar vermindert, aber noch deutlich ausgeprägt. Nach ig Infektion hatte die Splenektomie keinen zusätzlich

hemmenden Effekt auf die T-Zell-Antworten in der Leber und der Darmmukosa. Es gibt mehrere Möglichkeiten, die Herkunft dieser antigenspezifischen Zellen zu erklären. Eine Erklärung wäre, dass das FTY720 das Auswandern aktivierter T-Zellen aus den Lymphknoten nicht vollständig unterbindet. Möglich ist, dass insbesondere aus den MLN, die sich von den PLN in einigen Eigenschaften unterscheiden (Mebius, 03; von Andrian und Mempel, 03), T-Zellen auswandern können. Außerdem ist denkbar, dass die Lm-Infektion zu einer teilweisen Zerstörung der normalen Gewebeorganisation in den Lymphknoten führt und daher ein S1P1-unabhängiges Auswandern von T-Zellen aus den Lymphknoten eher möglich wird. Es könnte aber auch tatsächlich eine T-Zell-Aktivierung direkt in der Leber oder der Darmmukosa stattfinden, ohne dass sekundäre lymphoide Organe involviert sind. Für die Leber wurde eine T-Zell-Aktivierung im Parenchym oder den Lebersinusoiden beschrieben. Allerdings ist es strittig, ob eine solche Aktivierung zu einer Differenzierung in Effektor-T-Zellen oder zur Ausbildung von Toleranz führt (Klein und Crispe, 06; Wuensch *et al.*, 06; Limmer *et al.*, 00; Bowen *et al.*, 04; Bertolino *et al.*, 01). Ein Priming in der Leber könnte auch in tertiären lymphoiden Organen, die als Folge der Infektion entstehen können, stattfinden (Moyron-Quiroz *et al.*, 04; Drayton *et al.*, 06). Für ein sequentielles Ausbilden tertiärer lymphoider Organe und eine anschließende T-Zell-Aktivierung in diesen Strukturen ist der Zeitraum zwischen Infektion und Eradikation der Bakterien durch Immunzellen der Maus aber recht kurz. Ein solcher Effekt sollte am Tag 9 nach Infektion noch nicht messbar sein. In der Darmmukosa könnten zum Infektionszeitpunkt bereits vorhandene Cryptopatches und isolierte lymphoide Follikel Orte einer T-Zell-Aktivierung sein (Drayton *et al.*, 06). Ob FTY720 einen Einfluss auf die Auswanderung von Zellen aus solchen induzierbaren lymphoiden Strukturen hat, ist unklar.

Die unterschiedliche Fähigkeit FTY720-behandelter und zusätzlich splenektomierter Tiere zur Induktion von T-Zell-Antworten je nach Infektionsroute und -Dosierung kann mit einer unterschiedlich starken Ausbreitung der Bakterien in Abhängigkeit von diesen Parametern zusammenhängen. So ist es z.B. denkbar, dass nach einer höher dosierten iv Infektion die Listerien auch in die Darmmukosa und das MALT gelangen, während sie nach einer niedrig-dosierten iv Infektion im wesentlichen auf Milz und Leber beschränkt bleiben. Diese Unterschiede in der Bakterienverbreitung könnten auch zumindest teilweise erklären, warum nach einer niedrig-dosierten LmOVA-Infektion eine Splenektomie alleine ohne zusätzliche FTY720-Behandlung die T-Zell-Antwort in der Leber sehr stark verminderte. Diese Beobachtung impliziert, dass unter diesen Bedingungen nahezu keine T-Zell-Aktivierung in den Lymphknoten stattfindet. Ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der Erforderlichkeit

lymphoider Strukturen in Abhängigkeit von der Infektionsroute und -Dosis für die primäre T-Zell-Antwort auf eine Listerien-Infektion wurden in einer unabhängigen Studie zeitgleich von Klonowski *et al.* beschrieben (Klonowski *et al.*, 06). Für die Untersuchungen wurden dort wt- und Lymphotoxin- α -defiziente Mäuse verwendet, die ebenfalls zum Teil splenektomiert wurden. Diese Gruppe konnte zusätzlich zeigen, dass bei einer Infektion mit dem *Vesicular Stomatitis Virus* im Gegensatz zu einer Listerien-Infektion eher die Lymphknoten für die Induktion einer T-Zell-Antwort erforderlich sind, während die Milz in diesem Modell für das T-Zell-Priming nur eine untergeordnete Rolle spielt. Die Art, die Dosis und die präferentiellen Zielorgane des Pathogens scheinen also zu bestimmen, in welchem Umfang individuelle sekundäre lymphoide Organe für die primäre T-Zell-Aktivierung erforderlich sind.

5.2.3 Sekundäre T-Zell-Antworten in FTY720-behandelten und/oder splenektomierten Mäusen

Für die Induktion sekundärer T-Zell-Antworten nach iv Infektion mit LmOVA ergab sich ein ähnliches Bild wie für die Primärantworten. FTY720 bewirkte eine Verminderung sekundärer CD8⁺ T-Zell-Antworten. Diese Antworten bewegten sich im Bereich der Hintergrundfrequenzen, wenn die Tiere nach der Primärantwort splenektomiert wurden. Die Verminderung der T-Zell-Antworten war bei den CD4⁺ T-Zellen nicht so ausgeprägt wie bei den CD8⁺ T-Zellen. Auch für die Sekundärantwort verursachte die Splenektomie alleine ohne zusätzlich FTY720-Behandlung eine starke Verringerung der CD8⁺ T-Zell-Antworten in der Leber und den MLN (nicht gezeigte Daten) der re-infizierten Tiere. Der Einbruch der Sekundärantworten ließ sich nicht damit begründen, dass durch die Entnahme der Milz nach der Primärinfektion ein Großteil der Gedächtnis-T-Zellen, welche sich in diesem Organ befanden, entfernt worden waren. Nach einem Transfer von Gedächtnis-T-Zellen in bereits splenektomierte naive Mäuse, wanderten diese Zellen effizient in die Leber ein. Die T-Zell-Population vergrößerte sich nach einer Infektion der Rezipienten aber nicht. Sekundäre T-Zell-Antworten in den peripheren Geweben waren bei dieser Versuchsanordnung aber nicht komplett unterbunden. Eine begrenzte Anzahl an Gedächtnis-T-Zellen konnte auch in splenektomierten und/oder FTY720 behandelten Tieren detektiert werden. Dennoch zeigen diese Ergebnisse, dass sekundäre lymphoide Organe auch für eine vollständige sekundäre T-Zell-Antwort nach Listerieninfektion erforderlich sind. Die Bedeutung der Milz für eine effiziente Aktivierung und Expansion von CD8⁺ T-Zellen nach einer iv Sekundärinfektion wurde ebenfalls parallel von Klonowski *et al.* gezeigt (Klonowski *et al.*, 06). Diese Gruppe zeigte außerdem, dass die Milz nach einer oralen Sekundärinfektion eine weit geringere Rolle für die effiziente T-Zell-Aktivierung spielte. Die Infektionsroute ist also auch bei einer

Sekundärinfektion bedeutsam und beeinflusst, in welchem Maße bestimmte lymphoide Gewebe für eine T-Zell-Aktivierung erforderlich sind.

Gedächtnis-T-Zellen können aufgrund ihres Phänotyps und ihrer Funktion in mindestens zwei Untergruppen eingeteilt werden. Effektor-Gedächtnis-T-Zellen sind in der Milz und in peripheren Geweben zu finden und weisen nach Antigenkontakt sofortige Effektor-Funktionen auf. Die Proliferation dieser Zellen nach Antigen-Kontakt ist dagegen eingeschränkt. Zentrale-Gedächtnis-T-Zellen befinden sich im Wesentlichen in der Milz und den Lymphknoten und proliferieren nach Antigen-Kontakt recht stark (Masopust *et al.*, 01b; Wherry *et al.*, 03; Roberts *et al.*, 05; Bachmann *et al.*, 05; Huster *et al.*, 06). Die Ergebnisse der hier vorliegenden Untersuchung könnten bedeuten, dass in Abwesenheit funktioneller sekundärer lymphoider Organe vor allem Zentrale-Gedächtnis-T-Zellen beeinträchtigt werden, während Effektor-Gedächtnis-T-Zellen in ihrer Funktion nicht gestört werden. Zentrale-Gedächtnis-T-Zellen könnten eventuell nicht zu einer Einwanderung in periphere Gewebe fähig sein (Stock *et al.*, 06), oder der Antigen-Kontakt von Zentralen-Gedächtnis-T-Zellen außerhalb sekundärer lymphoider Organe führt nur zu einer unvollständigen Aktivierung dieser Zellen. Im Gegensatz dazu können Effektor-Gedächtnis-T-Zellen leicht in periphere Gewebe einwandern. Sie werden daran durch FTY720 nicht gehindert, da sie nicht durch die Lymphknoten zirkulieren. Anscheinend müssen zumindest für eine Untergruppe der Gedächtnis-T-Zellen komplexere Anforderungen für eine komplette Aktivierung erfüllt werden. Möglicherweise können die entsprechenden Bedingungen nur innerhalb lymphoider Strukturen geboten werden. Kürzlich wurde für Zentrale-Gedächtnis-T-Zellen tatsächlich gezeigt, dass sie striktere Anforderungen an eine Aktivierung stellen, als bislang angenommen. Die Aktivierung von CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen in einem Influenza-Infektionsmodell war von radiosensitiven aus dem Knochenmark stammenden Antigen-präsentierenden-Zellen abhängig (Belz *et al.*, 06). Eine Depletion der Dendritischen Zellen vor einer Listerien- oder Influenza-Infektion reduzierte die sekundäre CD8⁺ T-Zell-Antwort signifikant (Zammit *et al.*, 05). In dem letzteren Modell war besonders die Antwort der Zentralen-Gedächtnis-CD8⁺-T-Zellen eingeschränkt (Zammit *et al.*, 05).

Je nach Infektionsroute und voraussichtlich auch in Abhängigkeit von der Art des Pathogens sind also auch für die vollständige Aktivierung und die Proliferation von Gedächtnis-T-Zellen nach einer Sekundärinfektion lymphoide Strukturen essentiell. Welche Faktoren in diesen Strukturen genau für die Induktion der Sekundärantworten verantwortlich sind, ob dies, wie oben angedeutet, bestimmte Populationen Dendritischer Zellen oder z.B. auch von Stroma-Zellen bereitgestellte Faktoren sind, bleibt zu klären.

Literatur

Aldrich, C. J.; DeCloux, A.; Woods, A. S.; Cotter, R. J.; Soloski, M. J. und Forman, J. (1994): Identification of a Tap-dependent leader peptide recognized by alloreactive T cells specific for a class Ib antigen, *Cell* (Band 79), Nr. 4, Seite 649-658. URL: PM:7525079

Aloisi, F. und Pujol-Borrell, R. (2006): Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases, *Nat.Rev.Immunol.* (Band 6), Nr. 3, Seite 205-217. URL: PM:16498451

Altman J.D. und Davis M.M. (2003): MHC-Peptide Tetramers to Visualize Antigen-Specific T Cells, *Current Protocols in Immunology* (Band UNIT 17.3).

Assarsson, E.; Kambayashi, T.; Persson, C. M.; Chambers, B. J. und Ljunggren, H. G. (2005): 2B4/CD48-mediated regulation of lymphocyte activation and function, *J.Immunol.* (Band 175), Nr. 4, Seite 2045-2049. URL: PM:16081768

Assarsson, E.; Kambayashi, T.; Sandberg, J. K.; Hong, S.; Taniguchi, M.; Van Kaer, L.; Ljunggren, H. G. und Chambers, B. J. (2000): CD8+ T cells rapidly acquire NK1.1 and NK cell-associated molecules upon stimulation in vitro and in vivo, *J.Immunol.* (Band 165), Nr. 7, Seite 3673-3679. URL: PM:11034371

Bachmann, M. F.; Gallimore, A.; Linkert, S.; Cerundolo, V.; Lanzavecchia, A.; Kopf, M. und Viola, A. (1999): Developmental regulation of Lck targeting to the CD8 coreceptor controls signaling in naive and memory T cells, *The Journal of Experimental Medicine* (Band 189), Nr. 10, Seite 1521-1530. URL: PM:10330431

Bachmann, M. F.; Schwarz, K.; Wolint, P.; Meijerink, E.; Martin, S.; Manolova, V. und Oxenius, A. (2004): Cutting edge: distinct roles for T help and CD40/CD40 ligand in regulating differentiation of proliferation-competent memory CD8+ T cells, *J.Immunol.* (Band 173), Nr. 4, Seite 2217-2221. URL: PM:15294930

Bachmann, M. F.; Wolint, P.; Schwarz, K.; Jager, P. und Oxenius, A. (2005): Functional properties and lineage relationship of CD8+ T cell subsets identified by expression of IL-7 receptor alpha and CD62L, *J.Immunol.* (Band 175), Nr. 7, Seite 4686-4696. URL: PM:16177116

Bancroft, G. J.; Schreiber, R. D. und Unanue, E. R. (1991): Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse, *Immunol.Rev.* (Band 124), Seite 5-24. URL: PM:1804781

Bauer, S.; Groh, V.; Wu, J.; Steinle, A.; Phillips, J. H.; Lanier, L. L. und Spies, T. (1999): Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA, *Science* (Band 285), Nr. 5428, Seite 727-729. URL: PM:10426993

Beadling, C.; Druey, K. M.; Richter, G.; Kehrl, J. H. und Smith, K. A. (1999): Regulators of G protein signaling exhibit distinct patterns of gene expression and target G protein specificity in human lymphocytes, *J.Immunol.* (Band 162), Nr. 5, Seite 2677-2682. URL: PM:10072511

- Belz, G. T.; Wilson, N. S.; Smith, C. M.; Mount, A. M.; Carbone, F. R. und Heath, W. R. (2006): Bone marrow-derived cells expand memory CD8⁺ T cells in response to viral infections of the lung and skin, *Eur.J.Immunol.* (Band 36), Nr. 2, Seite 327-335. URL: PM:16402408
- Bertolino, P.; Bowen, D. G.; McCaughan, G. W. und Fazekas de St, Groth B. (2001): Antigen-specific primary activation of CD8⁺ T cells within the liver, *J.Immunol.* (Band 166), Nr. 9, Seite 5430-5438. URL: PM:11313380
- Bertram, E. M.; Dawicki, W.; Sedgmen, B.; Bramson, J. L.; Lynch, D. H. und Watts, T. H. (2004): A switch in costimulation from CD28 to 4-1BB during primary versus secondary CD8 T cell response to influenza in vivo, *J.Immunol.* (Band 172), Nr. 2, Seite 981-988. URL: PM:14707071
- Beyersdorf, N. B.; Ding, X.; Karp, K. und Hanke, T. (2001): Expression of inhibitory "killer cell lectin-like receptor G1" identifies unique subpopulations of effector and memory CD8 T cells, *Eur.J.Immunol.* (Band 31), Nr. 12, Seite 3443-3452. URL: PM:11745363
- Blaser, C.; Kaufmann, M. und Pircher, H. (1998): Virus-activated CD8 T cells and lymphokine-activated NK cells express the mast cell function-associated antigen, an inhibitory C-type lectin, *J.Immunol.* (Band 161), Nr. 12, Seite 6451-6454. URL: PM:9862665
- Borchers, M. T.; Harris, N. L.; Wesselkamper, S. C.; Zhang, S.; Chen, Y.; Young, L. und Lau, G. W. (2006): The NKG2D-activating receptor mediates pulmonary clearance of *Pseudomonas aeruginosa*, *Infect.Immun.* (Band 74), Nr. 5, Seite 2578-2586. URL: PM:16622193
- Borrego, F.; Ulbrecht, M.; Weiss, E. H.; Coligan, J. E. und Brooks, A. G. (1998): Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis, *The Journal of Experimental Medicine* (Band 187), Nr. 5, Seite 813-818. URL: PM:9480992
- Bowen, D. G.; Zen, M.; Holz, L.; Davis, T.; McCaughan, G. W. und Bertolino, P. (2004): The site of primary T cell activation is a determinant of the balance between intrahepatic tolerance and immunity, *J.Clin.Invest* (Band 114), Nr. 5, Seite 701-712. URL: PM:15343389
- Braud, V.; Jones, E. Y. und McMichael, A. (1997): The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal sequence-derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9, *Eur.J.Immunol.* (Band 27), Nr. 5, Seite 1164-1169. URL: PM:9174606
- Brinkmann, V. (2004): FTY720: mechanism of action and potential benefit in organ transplantation, *Yonsei Med.J.* (Band 45), Nr. 6, Seite 991-997. URL: PM:15627289
- Brinkmann, V.; Cyster, J. G. und Hla, T. (2004): FTY720: sphingosine 1-phosphate receptor-1 in the control of lymphocyte egress and endothelial barrier function, *Am.J.Transplant.* (Band 4), Nr. 7, Seite 1019-1025. URL: PM:15196057

Brinkmann, V.; Davis, M. D.; Heise, C. E.; Albert, R.; Cottens, S.; Hof, R.; Bruns, C.; Prieschl, E.; Baumruker, T.; Hiestand, P.; Foster, C. A.; Zollinger, M. und Lynch, K. R. (2002): The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors, *J.Biol.Chem.* (Band 277), Nr. 24, Seite 21453-21457. URL: PM:11967257

Brooks, A. G.; Posch, P. E.; Scorzelli, C. J.; Borrego, F. und Coligan, J. E. (1997): NKG2A complexed with CD94 defines a novel inhibitory natural killer cell receptor, *The Journal of Experimental Medicine* (Band 185), Nr. 4, Seite 795-800. URL: PM:9034158

Busch, D. H.; Pilip, I. M.; Vijn, S. und Pamer, E. G. (1998): Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection, *Immunity*. (Band 8), Nr. 3, Seite 353-362. URL: PM:9529152

Butcher, E. C. und Picker, L. J. (1996): Lymphocyte homing and homeostasis, *Science* (Band 272), Nr. 5258, Seite 60-66. URL: PM:8600538

Byers, A. M.; Andrews, N. P. und Lukacher, A. E. (2006): CD94/NKG2A Expression Is Associated with Proliferative Potential of CD8 T Cells during Persistent Polyoma Virus Infection, *J.Immunol.* (Band 176), Nr. 10, Seite 6121-6129. URL: PM:16670321

Camps, M.; Nichols, A. und Arkinstall, S. (2000): Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function, *FASEB J.* (Band 14), Nr. 1, Seite 6-16. URL: PM:10627275

Carayannopoulos, L. N.; Naidenko, O. V.; Fremont, D. H. und Yokoyama, W. M. (2002): Cutting edge: murine UL16-binding protein-like transcript 1: a newly described transcript encoding a high-affinity ligand for murine NKG2D, *J.Immunol.* (Band 169), Nr. 8, Seite 4079-4083. URL: PM:12370332

Cash, H. L.; Whitham, C. V.; Behrendt, C. L. und Hooper, L. V. (2006): Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin, *Science* (Band 313), Nr. 5790, Seite 1126-1130. URL: PM:16931762

Castriconi, R.; Cantoni, C.; Della, Chiesa M.; Vitale, M.; Marcenaro, E.; Conte, R.; Biassoni, R.; Bottino, C.; Moretta, L. und Moretta, A. (2003): Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of Nkp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 100), Nr. 7, Seite 4120-4125. URL: PM:12646700

Cerwenka, A.; Baron, J. L. und Lanier, L. L. (2001): Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 98), Nr. 20, Seite 11521-11526. URL: PM:11562472

Chandok, M. R. und Farber, D. L. (2004): Signaling control of memory T cell generation and function, *Semin.Immunol.* (Band 16), Nr. 5, Seite 285-293. URL: PM:15528073

Chang, C.; Dietrich, J.; Harpur, A. G.; Lindquist, J. A.; Haude, A.; Loke, Y. W.; King, A.; Colonna, M.; Trowsdale, J. und Wilson, M. J. (1999): Cutting edge: KAP10, a novel transmembrane adapter protein genetically linked to DAP12 but with unique signaling properties, *J.Immunol.* (Band 163), Nr. 9, Seite 4651-4654. URL: PM:10528161

Chin, R.; Zhou, P.; Alegre, M. L. und Fu, Y. X. (2001): Confounding factors complicate conclusions in aly model, *Nat.Med.* (Band 7), Nr. 11, Seite 1165-1166. URL: PM:11689861

Cose, S.; Brammer, C.; Khanna, K. M.; Masopust, D. und Lefrancois, L. (2006): Evidence that a significant number of naive T cells enter non-lymphoid organs as part of a normal migratory pathway, *Eur.J.Immunol.* (Band 36), Nr. 6, Seite 1423-1433. URL: PM:16708400

Cosman, D.; Mullberg, J.; Sutherland, C. L.; Chin, W.; Armitage, R.; Fanslow, W.; Kubin, M. und Chalupny, N. J. (2001): ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor, *Immunity.* (Band 14), Nr. 2, Seite 123-133. URL: PM:11239445

Cunningham, N. R.; Artim, S. C.; Fornadel, C. M.; Sellars, M. C.; Edmonson, S. G.; Scott, G.; Albino, F.; Mathur, A. und Punt, J. A. (2006): Immature CD4+CD8+ Thymocytes and Mature T Cells Regulate Nur77 Distinctly in Response to TCR Stimulation, *J.Immunol.* (Band 177), Nr. 10, Seite 6660-6666. URL: PM:17082578

Cupedo, T. und Mebius, R. E. (2005): Cellular interactions in lymph node development, *J.Immunol.* (Band 174), Nr. 1, Seite 21-25. URL: PM:15611222

Cyster, J. G. (2005): Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs, *Annu.Rev.Immunol.* (Band 23), Seite 127-159. URL: PM:15771568

Czeloth, N.; Bernhardt, G.; Hofmann, F.; Genth, H. und Forster, R. (2005): Sphingosine-1-phosphate mediates migration of mature dendritic cells, *J.Immunol.* (Band 175), Nr. 5, Seite 2960-2967. URL: PM:16116182

Diefenbach, A.; Hsia, J. K.; Hsiung, M. Y. und Raulet, D. H. (2003): A novel ligand for the NKG2D receptor activates NK cells and macrophages and induces tumor immunity, *Eur.J.Immunol.* (Band 33), Nr. 2, Seite 381-391. URL: PM:12645935

Diefenbach, A.; Jensen, E. R.; Jamieson, A. M. und Raulet, D. H. (2001): Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity, *Nature* (Band 413), Nr. 6852, Seite 165-171. URL: PM:11557981

Diefenbach, A.; Tomasello, E.; Lucas, M.; Jamieson, A. M.; Hsia, J. K.; Vivier, E. und Raulet, D. H. (2002): Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D, *Nat.Immunol.* (Band 3), Nr. 12, Seite 1142-1149. URL: PM:12426565

Dorner, B. G.; Scheffold, A.; Rolph, M. S.; Huser, M. B.; Kaufmann, S. H.; Radbruch, A.; Flesch, I. E. und Kroczeck, R. A. (2002): MIP-1alpha, MIP-1beta, RANTES, and

ATAC/lymphotactin function together with IFN-gamma as type 1 cytokines, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 99), Nr. 9, Seite 6181-6186. URL: PM:11972057

Drayton, D. L.; Liao, S.; Mounzer, R. H. und Ruddle, N. H. (2006): Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis, *Nat.Immunol.* (Band 7), Nr. 4, Seite 344-353. URL: PM:16550197

Eberl, Gerard (2005): INDUCIBLE LYMPHOID TISSUES IN THE ADULT GUT: RECAPITULATION OF A FETAL DEVELOPMENTAL PATHWAY?, *Nature Reviews Immunology* (Band 5), Nr. 5, Seite 413-420. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nri1600>

Ehrlich, L. I.; Ogasawara, K.; Hamerman, J. A.; Takaki, R.; Zingoni, A.; Allison, J. P. und Lanier, L. L. (2005): Engagement of NKG2D by cognate ligand or antibody alone is insufficient to mediate costimulation of human and mouse CD8⁺ T cells, *J.Immunol.* (Band 174), Nr. 4, Seite 1922-1931. URL: PM:15699119

Ericsson, A.; Svensson, M.; Arya, A. und Agace, W. W. (2004): CCL25/CCR9 promotes the induction and function of CD103 on intestinal intraepithelial lymphocytes, *Eur.J.Immunol.* (Band 34), Nr. 10, Seite 2720-2729. URL: PM:15368288

Feuerer, M.; Beckhove, P.; Garbi, N.; Mahnke, Y.; Limmer, A.; Hommel, M.; Hammerling, G. J.; Kyewski, B.; Hamann, A.; Umansky, V. und Schirmacher, V. (2003): Bone marrow as a priming site for T-cell responses to blood-borne antigen, *Nature Medicine* (Band 9), Nr. 9, Seite 1151-1157. URL: ISI:000185061600027

Foulds, K. E.; Zenewicz, L. A.; Shedlock, D. J.; Jiang, J.; Troy, A. E. und Shen, H. (2002): Cutting edge: CD4 and CD8 T cells are intrinsically different in their proliferative responses, *J.Immunol.* (Band 168), Nr. 4, Seite 1528-1532. URL: PM:11823476

Foussat, A.; Coulomb-L'Hermine, A.; Gosling, J.; Krzysiek, R.; Durand-Gasselin, I.; Schall, T.; Balian, A.; Richard, Y.; Galanaud, P. und Emilie, D. (2000): Fractalkine receptor expression by T lymphocyte subpopulations and in vivo production of fractalkine in human, *Eur.J.Immunol.* (Band 30), Nr. 1, Seite 87-97. URL: PM:10602030

Futterer, A.; Mink, K.; Luz, A.; Kosco-Vilbois, M. H. und Pfeffer, K. (1998): The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues, *Immunity.* (Band 9), Nr. 1, Seite 59-70. URL: PM:9697836

Gajewska, B. U.; Alvarez, D.; Vidric, M.; Goncharova, S.; Stampfli, M. R.; Coyle, A. J.; Gutierrez-Ramos, J. C. und Jordana, M. (2001): Generation of experimental allergic airways inflammation in the absence of draining lymph nodes, *J.Clin.Invest* (Band 108), Nr. 4, Seite 577-583. URL: PM:11518731

Garni-Wagner, B. A.; Purohit, A.; Mathew, P. A.; Bennett, M. und Kumar, V. (1993): A novel function-associated molecule related to non-MHC-restricted cytotoxicity mediated by activated natural killer cells and T cells, *J.Immunol.* (Band 151), Nr. 1, Seite 60-70. URL: PM:8326140

Gasser, S.; Orsulic, S.; Brown, E. J. und Raulet, D. H. (2005): The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor, *Nature* (Band 436), Nr. 7054, Seite 1186-1190. URL: ISI:000231416600052

Gilfillan, S.; Ho, E. L.; Cella, M.; Yokoyama, W. M. und Colonna, M. (2002): NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation, *Nat.Immunol.* (Band 3), Nr. 12, Seite 1150-1155. URL: PM:12426564

Gorelik, L. und Flavell, R. A. (2000): Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease, *Immunity*. (Band 12), Nr. 2, Seite 171-181. URL: PM:10714683

Groh, V.; Rhinehart, R.; Randolph-Habecker, J.; Topp, M. S.; Riddell, S. R. und Spies, T. (2001): Costimulation of CD8alphabeta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells, *Nat.Immunol.* (Band 2), Nr. 3, Seite 255-260. URL: PM:11224526

Groh, V.; Wu, J.; Yee, C. und Spies, T. (2002): Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation, *Nature* (Band 419), Nr. 6908, Seite 734-738. URL: ISI:000178615200044

Grundemann, C.; Bauer, M.; Schweier, O.; von Oppen, N.; Lassing, U.; Saudan, P.; Becker, K. F.; Karp, K.; Hanke, T.; Bachmann, M. F. und Pircher, H. (2006): Cutting edge: identification of e-cadherin as a ligand for the murine killer cell lectin-like receptor g1, *J.Immunol.* (Band 176), Nr. 3, Seite 1311-1315. URL: PM:16424155

Guma, M.; Busch, L. K.; Salazar-Fontana, L. I.; Bellosillo, B.; Morte, C.; Garcia, P. und Lopez-Botet, M. (2005): The CD94/NKG2C killer lectin-like receptor constitutes an alternative activation pathway for a subset of CD8+ T cells, *Eur.J.Immunol.* (Band 35), Nr. 7, Seite 2071-2080. URL: PM:15940674

Gunturi, A.; Berg, R. E.; Crossley, E.; Murray, S. und Forman, J. (2005): The role of TCR stimulation and TGF-beta in controlling the expression of CD94/NKG2A receptors on CD8 T cells, *Eur.J.Immunol.* (Band 35), Nr. 3, Seite 766-775. URL: PM:15714583

Guthmann, M. D.; Tal, M. und Pecht, I. (1995): A secretion inhibitory signal transduction molecule on mast cells is another C-type lectin, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 92), Nr. 20, Seite 9397-9401. URL: PM:7568140

Habicht, Antje; Clarkson, Michael R.; Yang, Jun; Henderson, Joel; Brinkmann, Volker; Fernandes, Stacey; Jurewicz, Mollie; Yuan, Xueli und Sayegh, Mohamed H. (2006): Novel Insights into the Mechanism of Action of FTY720 in a Transgenic Model of Allograft Rejection: Implications for Therapy of Chronic Rejection, *The Journal of Immunology* (Band 176), Nr. 1, Seite 36-42. URL: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/abstract/176/1/36>

Haller, C.; Fillatreau, S.; Hoffmann, R. und Agenes, F. (2002): Structure, chromosomal localization and expression of the mouse regulator of G-protein signaling10 gene (mRGS10), *Gene* (Band 297), Nr. 1-2, Seite 39-49. URL: PM:12384284

Hamerman, J. A.; Ogasawara, K. und Lanier, L. L. (2004): Cutting edge: Toll-like receptor signaling in macrophages induces ligands for the NKG2D receptor, *J.Immunol.* (Band 172), Nr. 4, Seite 2001-2005. URL: PM:14764662

Han, S. B.; Moratz, C.; Huang, N. N.; Kelsall, B.; Cho, H.; Shi, C. S.; Schwartz, O. und Kehrl, J. H. (2005): Rgs1 and Gnai2 regulate the entrance of B lymphocytes into lymph nodes and B cell motility within lymph node follicles, *Immunity.* (Band 22), Nr. 3, Seite 343-354. URL: PM:15780991

Hanke, T.; Corral, L.; Vance, R. E. und Raulet, D. H. (1998): 2F1 antigen, the mouse homolog of the rat "mast cell function-associated antigen", is a lectin-like type II transmembrane receptor expressed by natural killer cells, *Eur.J.Immunol.* (Band 28), Nr. 12, Seite 4409-4417. URL: PM:9862378

Harcourt, J.; Alvarez, R.; Jones, L. P.; Henderson, C.; Anderson, L. J. und Tripp, R. A. (2006): Respiratory syncytial virus G protein and G protein CX3C motif adversely affect CX3CR1+ T cell responses, *J.Immunol.* (Band 176), Nr. 3, Seite 1600-1608. URL: PM:16424189

Harriman, G. R.; Hornqvist, E. und Lycke, N. Y. (1992): Antigen-specific and polyclonal CD4+ lamina propria T-cell lines: phenotypic and functional characterization, *Immunology* (Band 75), Nr. 1, Seite 66-73. URL: PM:1371494

Hla, T.; Lee, M. J.; Ancellin, N.; Paik, J. H. und Kluk, M. J. (2001): Lysophospholipids--receptor revelations, *Science* (Band 294), Nr. 5548, Seite 1875-1878. URL: PM:11729304

Hogquist, K. A.; Jameson, S. C.; Heath, W. R.; Howard, J. L.; Bevan, M. J. und Carbone, F. R. (1994): T cell receptor antagonist peptides induce positive selection, *Cell* (Band 76), Nr. 1, Seite 17-27. URL: PM:8287475

Holla, V. R.; Mann, J. R.; Shi, Q. und DuBois, R. N. (2006): Prostaglandin E2 regulates the nuclear receptor NR4A2 in colorectal cancer, *J.Biol.Chem.* (Band 281), Nr. 5, Seite 2676-2682. URL: PM:16293616

Houchins, J. P.; Lanier, L. L.; Niemi, E. C.; Phillips, J. H. und Ryan, J. C. (1997): Natural killer cell cytolytic activity is inhibited by NKG2-A and activated by NKG2-C, *J.Immunol.* (Band 158), Nr. 8, Seite 3603-3609. URL: PM:9103421

Houchins, J. P.; Yabe, T.; McSherry, C. und Bach, F. H. (1991): DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells, *The Journal of Experimental Medicine* (Band 173), Nr. 4, Seite 1017-1020. URL: PM:2007850

Hue, S.; Mention, J. J.; Monteiro, R. C.; Zhang, S.; Cellier, C.; Schmitz, J.; Verkarre, V.; Fodil, N.; Bahram, S.; Cerf-Bensussan, N. und Caillat-Zucman, S. (2004): A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease, *Immunity.* (Band 21), Nr. 3, Seite 367-377. URL: PM:15357948

Huleatt, J. W.; Pilip, I.; Kerksiek, K. und Pamer, E. G. (2001): Intestinal and splenic T cell responses to enteric *Listeria monocytogenes* infection: distinct repertoires of responding CD8 T lymphocytes, *J.Immunol.* (Band 166), Nr. 6, Seite 4065-4073. URL: PM:11238655

Huster, K. M.; Koffler, M.; Stemberger, C.; Schiemann, M.; Wagner, H. und Busch, D. H. (2006): Unidirectional development of CD8⁺ central memory T cells into protective *Listeria*-specific effector memory T cells, *Eur.J.Immunol.* (Band 36), Nr. 6, Seite 1453-1464. URL: PM:16637009

Ito, M.; Maruyama, T.; Saito, N.; Koganei, S.; Yamamoto, K. und Matsumoto, N. (2006): Killer cell lectin-like receptor G1 binds three members of the classical cadherin family to inhibit NK cell cytotoxicity, *The Journal of Experimental Medicine*. URL: PM:16461340

Itoh, T. und Teraoka, H. (1993): Cloning and tissue-specific expression of cDNAs for the human and mouse homologues of rat pancreatitis-associated protein (PAP), *Biochim.Biophys.Acta* (Band 1172), Nr. 1-2, Seite 184-186. URL: PM:7679928

Iwata, M.; Hirakiyama, A.; Eshima, Y.; Kagechika, H.; Kato, C. und Song, S. Y. (2004): Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells, *Immunity*. (Band 21), Nr. 4, Seite 527-538. URL: PM:15485630

Jabri, B.; de Serre, N. P.; Cellier, C.; Evans, K.; Gache, C.; Carvalho, C.; Mougenot, J. F.; Allez, M.; Jian, R.; Desreumaux, P.; Colombel, J. F.; Matuchansky, C.; Cugnenc, H.; Lopez-Botet, M.; Vivier, E.; Moretta, A.; Roberts, A. I.; Ebert, E. C.; Guy-Grand, D.; Brousse, N.; Schmitz, J. und Cerf-Bensussan, N. (2000): Selective expansion of intraepithelial lymphocytes expressing the HLA-E-specific natural killer receptor CD94 in celiac disease, *Gastroenterology* (Band 118), Nr. 5, Seite 867-879. URL: PM:10784586

Jamieson, A. M.; Diefenbach, A.; McMahon, C. W.; Xiong, N.; Carlyle, J. R. und Raulet, D. H. (2002): The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing, *Immunity*. (Band 17), Nr. 1, Seite 19-29. URL: PM:12150888

Jan, Chalupny N.; Sutherland, C. L.; Lawrence, W. A.; Rein-Weston, A. und Cosman, D. (2003): ULBP4 is a novel ligand for human NKG2D, *Biochem.Biophys.Res.Comm.* (Band 305), Nr. 1, Seite 129-135. URL: PM:12732206

Johansson-Lindbom, B.; Svensson, M.; Wurbel, M. A.; Malissen, B.; Marquez, G. und Agace, W. (2003): Selective generation of gut tropic T cells in gut-associated lymphoid tissue (GALT): requirement for GALT dendritic cells and adjuvant, *The Journal of Experimental Medicine* (Band 198), Nr. 6, Seite 963-969. URL: PM:12963696

Karre, K.; Ljunggren, H. G.; Piontek, G. und Kiessling, R. (1986): Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy, *Nature* (Band 319), Nr. 6055, Seite 675-678. URL: PM:3951539

Kaufmann, S. H. E. (2003): Immunity to intracellular bacteria, Paul, W. E., *Fundamental Immunology*, Seite 1229-1261.

Kilshaw, P. J. und Murant, S. J. (1990): A new surface antigen on intraepithelial lymphocytes in the intestine, *Eur.J.Immunol.* (Band 20), Nr. 10, Seite 2201-2207. URL: PM:2242756

Kimachi, K.; Sugie, K. und Grey, H. M. (2003): Effector T cells have a lower ligand affinity threshold for activation than naive T cells, *Int.Immunol.* (Band 15), Nr. 7, Seite 885-892. URL: PM:12807827

Kimura, T.; Sato, K.; Kuwabara, A.; Tomura, H.; Ishiwara, M.; Kobayashi, I.; Ui, M. und Okajima, F. (2001): Sphingosine 1-phosphate may be a major component of plasma lipoproteins responsible for the cytoprotective actions in human umbilical vein endothelial cells, *J.Biol.Chem.* (Band 276), Nr. 34, Seite 31780-31785. URL: PM:11427538

Klein, I. und Crispe, I. N. (2006): Complete differentiation of CD8+ T cells activated locally within the transplanted liver, *The Journal of Experimental Medicine*. URL: PM:16476766

Klonowski, K. D.; Marzo, A. L.; Williams, K. J.; Lee, S. J.; Pham, Q. M. und Lefrancois, L. (2006): CD8 T cell recall responses are regulated by the tissue tropism of the memory cell and pathogen, *J.Immunol.* (Band 177), Nr. 10, Seite 6738-6746. URL: PM:17082587

Koyama, S. Y. und Podolsky, D. K. (1989): Differential expression of transforming growth factors alpha and beta in rat intestinal epithelial cells, *J.Clin.Invest* (Band 83), Nr. 5, Seite 1768-1773. URL: PM:2708531

Kumaraguru, U.; Davis, I. A.; Deshpande, S.; Tevethia, S. S. und Rouse, B. T. (2001): Lymphotoxin alpha-/- mice develop functionally impaired CD8+ T cell responses and fail to contain virus infection of the central nervous system, *J.Immunol.* (Band 166), Nr. 2, Seite 1066-1074. URL: PM:11145686

Kursar, M.; Bonhagen, K.; Kohler, A.; Kamradt, T.; Kaufmann, S. H. und Mittrucker, H. W. (2002): Organ-specific CD4+ T cell response during *Listeria monocytogenes* infection, *J.Immunol.* (Band 168), Nr. 12, Seite 6382-6387. URL: PM:12055256

Kursar, M.; Bonhagen, K.; Kohler, A.; Kamradt, T.; Kaufmann, S. H. und Mittrucker, H. W. (2004): Antigen-specific CD8+ T cell responses in intestinal tissues during murine listeriosis, *Microbes.Infect.* (Band 6), Nr. 1, Seite 8-16. URL: PM:14738888

Ladel, C. H.; Flesch, I. E.; Arnoldi, J. und Kaufmann, S. H. (1994): Studies with MHC-deficient knock-out mice reveal impact of both MHC I- and MHC II-dependent T cell responses on *Listeria monocytogenes* infection [published erratum appears in *J Immunol* 1995 Apr 15;154(8):4223], *The Journal of Immunology* (Band 153), Nr. 7, Seite 3116-3122. URL: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/abstract/153/7/3116>

Lanier, L. L.; Corliss, B.; Wu, J. und Phillips, J. H. (1998): Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors, *Immunity*. (Band 8), Nr. 6, Seite 693-701. URL: PM:9655483

Laouar, A.; Haridas, V.; Vargas, D.; Zhinan, X.; Chaplin, D.; van Lier, R. A. und Manjunath, N. (2005): CD70+ antigen-presenting cells control the proliferation and differentiation of T

cells in the intestinal mucosa, *Nat.Immunol.* (Band 6), Nr. 7, Seite 698-706. URL: PM:15937486

Latner, D. R.; Kaech, S. M. und Ahmed, R. (2004): Enhanced expression of cell cycle regulatory genes in virus-specific memory CD8⁺ T cells, *J.Virol.* (Band 78), Nr. 20, Seite 10953-10959. URL: PM:15452215

Lazetic, S.; Chang, C.; Houchins, J. P.; Lanier, L. L. und Phillips, J. H. (1996): Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits, *J.Immunol.* (Band 157), Nr. 11, Seite 4741-4745. URL: PM:8943374

Lee, J. C.; Lee, K. M.; Kim, D. W. und Heo, D. S. (2004a): Elevated TGF-beta1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients, *J.Immunol.* (Band 172), Nr. 12, Seite 7335-7340. URL: PM:15187109

Lee, K. M.; McNerney, M. E.; Stepp, S. E.; Mathew, P. A.; Schatzle, J. D.; Bennett, M. und Kumar, V. (2004b): 2B4 acts as a non-major histocompatibility complex binding inhibitory receptor on mouse natural killer cells, *The Journal of Experimental Medicine* (Band 199), Nr. 9, Seite 1245-1254. URL: PM:15123744

Lee, N.; Goodlett, D. R.; Ishitani, A.; Marquardt, H. und Geraghty, D. E. (1998): HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences, *J.Immunol.* (Band 160), Nr. 10, Seite 4951-4960. URL: PM:9590243

Limmer, A.; Ohl, J.; Kurts, C.; Ljunggren, H. G.; Reiss, Y.; Groettrup, M.; Momburg, F.; Arnold, B. und Knolle, P. A. (2000): Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8⁺ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance, *Nat.Med.* (Band 6), Nr. 12, Seite 1348-1354. URL: PM:11100119

Ljutic, B.; Carlyle, J. R.; Filipp, D.; Nakagawa, R.; Julius, M. und Zuniga-Pflucker, J. C. (2005): Functional requirements for signaling through the stimulatory and inhibitory mouse NKR-P1 (CD161) NK cell receptors, *J.Immunol.* (Band 174), Nr. 8, Seite 4789-4796. URL: PM:15814704

Loetscher, P.; Pellegrino, A.; Gong, J. H.; Mattioli, I.; Loetscher, M.; Bardi, G.; Baggiolini, M. und Clark-Lewis, I. (2001): The ligands of CXC chemokine receptor 3, I-TAC, Mig, and IP10, are natural antagonists for CCR3, *J.Biol.Chem.* (Band 276), Nr. 5, Seite 2986-2991. URL: PM:11110785

Lohwasser, S.; Hande, P.; Mager, D. L. und Takei, F. (1999): Cloning of murine NKG2A, B and C: second family of C-type lectin receptors on murine NK cells, *Eur.J.Immunol.* (Band 29), Nr. 3, Seite 755-761. URL: PM:10092077

London, C. A.; Lodge, M. P. und Abbas, A. K. (2000): Functional responses and costimulator dependence of memory CD4⁺ T cells, *J.Immunol.* (Band 164), Nr. 1, Seite 265-272. URL: PM:10605020

Lund, F. E.; Partida-Sanchez, S.; Lee, B. O.; Kusser, K. L.; Hartson, L.; Hogan, R. J.; Woodland, D. L. und Randall, T. D. (2002): Lymphotoxin- α -deficient mice make delayed, but effective, T and B cell responses to influenza, *J.Immunol.* (Band 169), Nr. 9, Seite 5236-5243. URL: PM:12391242

Maasho, K.; Opoku-Anane, J.; Marusina, A. I.; Coligan, J. E. und Borrego, F. (2005): Cutting edge: NKG2D is a costimulatory receptor for human naive CD8(+) T cells, *Journal of Immunology* (Band 174), Nr. 8, Seite 4480-4484. URL: ISI:000228234600008

Mandala, S.; Hajdu, R.; Bergstrom, J.; Quackenbush, E.; Xie, J.; Milligan, J.; Thornton, R.; Shei, G. J.; Card, D.; Keohane, C.; Rosenbach, M.; Hale, J.; Lynch, C. L.; Rupprecht, K.; Parsons, W. und Rosen, H. (2002): Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists, *Science* (Band 296), Nr. 5566, Seite 346-349. URL: PM:11923495

Markiewicz, M. A.; Carayannopoulos, L. N.; Naidenko, O. V.; Matsui, K.; Burack, W. R.; Wise, E. L.; Fremont, D. H.; Allen, P. M.; Yokoyama, W. M.; Colonna, M. und Shaw, A. S. (2005): Costimulation through NKG2D enhances murine CD8⁺ CTL function: similarities and differences between NKG2D and CD28 costimulation, *J.Immunol.* (Band 175), Nr. 5, Seite 2825-2833. URL: PM:16116168

Marzo, A. L.; Vezys, V.; Klonowski, K. D.; Lee, S. J.; Muralimohan, G.; Moore, M.; Tough, D. F. und Lefrancois, L. (2004): Fully functional memory CD8 T cells in the absence of CD4 T cells, *J.Immunol.* (Band 173), Nr. 2, Seite 969-975. URL: PM:15240684

Masopust, D.; Jiang, J.; Shen, H. und Lefrancois, L. (2001a): Direct analysis of the dynamics of the intestinal mucosa CD8 T cell response to systemic virus infection, *J.Immunol.* (Band 166), Nr. 4, Seite 2348-2356. URL: PM:11160292

Masopust, D.; Vezys, V.; Marzo, A. L. und Lefrancois, L. (2001b): Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue, *Science* (Band 291), Nr. 5512, Seite 2413-2417. URL: PM:11264538

Masopust, D.; Vezys, V.; Wherry, E. J.; Barber, D. L. und Ahmed, R. (2006): Cutting edge: gut microenvironment promotes differentiation of a unique memory CD8 T cell population, *J.Immunol.* (Band 176), Nr. 4, Seite 2079-2083. URL: PM:16455963

Matloubian, M.; Lo, C. G.; Cinamon, G.; Lesneski, M. J.; Xu, Y.; Brinkmann, V.; Allende, M. L.; Proia, R. L. und Cyster, J. G. (2004): Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1, *Nature* (Band 427), Nr. 6972, Seite 355-360. URL: PM:14737169

McGregor, D. D.; Koster, F. T. und Mackaness, G. B. (1970): The short lived small lymphocyte as a mediator of cellular immunity, *Nature* (Band 228), Nr. 5274, Seite 855-856. URL: PM:5477011

McMahon, C. W.; Zajac, A. J.; Jamieson, A. M.; Corral, L.; Hammer, G. E.; Ahmed, R. und Raulet, D. H. (2002): Viral and bacterial infections induce expression of multiple NK cell

receptors in responding CD8(+) T cells, *J.Immunol.* (Band 169), Nr. 3, Seite 1444-1452. URL: PM:12133970

Mebius, R. E. (2003): Organogenesis of lymphoid tissues, *Nature Reviews Immunology* (Band 3), Nr. 4, Seite 292-303. URL: ISI:000182196100013

Mebius, R. E. und Kraal, G. (2005): Structure and function of the spleen, *Nature Reviews Immunology* (Band 5), Nr. 8, Seite 606-616. URL: ISI:000230880900012

Meresse, B.; Chen, Z. G.; Ciszewski, C.; Tretiakova, M.; Bhagat, G.; Krausz, T. N.; Raulet, D. H.; Lanier, L. L.; Groh, V.; Spies, T.; Ebert, E. C.; Green, P. H. und Jabri, B. (2004): Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease, *Immunity* (Band 21), Nr. 3, Seite 357-366. URL: ISI:000224034900007

Meresse, B.; Curran, S. A.; Ciszewski, C.; Orbelyan, G.; Setty, M.; Bhagat, G.; Lee, L.; Tretiakova, M.; Semrad, C.; Kistner, E.; Winchester, R. J.; Braud, V.; Lanier, L. L.; Geraghty, D. E.; Green, P. H.; Guandalini, S. und Jabri, B. (2006): Reprogramming of CTLs into natural killer-like cells in celiac disease, *The Journal of Experimental Medicine* (Band 203), Nr. 5, Seite 1343-1355. URL: PM:16682498

Miller, J. D.; Peters, M.; Oran, A. E.; Beresford, G. W.; Harrington, L.; Boss, J. M. und Altman, J. D. (2002): CD94/NKG2 expression does not inhibit cytotoxic function of lymphocytic choriomeningitis virus-specific CD8+ T cells, *J.Immunol.* (Band 169), Nr. 2, Seite 693-701. URL: PM:12097371

Mora, J. R.; Bono, M. R.; Manjunath, N.; Weninger, W.; Cavanagh, L. L.; Roseblatt, M. und von Andrian, U. H. (2003): Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells, *Nature* (Band 424), Nr. 6944, Seite 88-93. URL: PM:12840763

Morris, M. A.; Gibb, D. R.; Picard, F.; Brinkmann, V.; Straume, M. und Ley, K. (2005): Transient T cell accumulation in lymph nodes and sustained lymphopenia in mice treated with FTY720, *Eur.J.Immunol.* (Band 35), Nr. 12, Seite 3570-3580. URL: PM:16285007

Moser, J. M.; Gibbs, J.; Jensen, P. E. und Lukacher, A. E. (2002): CD94-NKG2A receptors regulate antiviral CD8(+) T cell responses, *Nat.Immunol.* (Band 3), Nr. 2, Seite 189-195. URL: PM:11812997

Moyron-Quiroz, J. E.; Rangel-Moreno, J.; Kusser, K.; Hartson, L.; Sprague, F.; Goodrich, S.; Woodland, D. L.; Lund, F. E. und Randall, T. D. (2004): Role of inducible bronchus associated lymphoid tissue (iBALT) in respiratory immunity, *Nat.Med.* (Band 10), Nr. 9, Seite 927-934. URL: PM:15311275

Muehlhoefer, A.; Saubermann, L. J.; Gu, X.; Luedtke-Heckenkamp, K.; Xavier, R.; Blumberg, R. S.; Podolsky, D. K.; MacDermott, R. P. und Reinecker, H. C. (2000): Fractalkine is an epithelial and endothelial cell-derived chemoattractant for intraepithelial lymphocytes in the small intestinal mucosa, *J.Immunol.* (Band 164), Nr. 6, Seite 3368-3376. URL: PM:10706732

Murphy, E. P. und Conneely, O. M. (1997): Neuroendocrine regulation of the hypothalamic pituitary adrenal axis by the nurr1/nur77 subfamily of nuclear receptors, *Mol.Endocrinol.* (Band 11), Nr. 1, Seite 39-47. URL: PM:8994186

Narushima, Y.; Unno, M.; Nakagawara, K.; Mori, M.; Miyashita, H.; Suzuki, Y.; Noguchi, N.; Takasawa, S.; Kumagai, T.; Yonekura, H. und Okamoto, H. (1997): Structure, chromosomal localization and expression of mouse genes encoding type III Reg, RegIII alpha, RegIII beta, RegIII gamma, *Gene* (Band 185), Nr. 2, Seite 159-168. URL: PM:9055810

Nickol, A. D. und Bonventre, P. F. (1977): Anomalous high native resistance to athymic mice to bacterial pathogens, *Infect.Immun.* (Band 18), Nr. 3, Seite 636-645. URL: PM:412787

Ogasawara, K.; Hamerman, J. A.; Ehrlich, L. R.; Bour-Jordan, H.; Santamaria, P.; Bluestone, J. A. und Lanier, L. L. (2004): NKG2D blockade prevents autoimmune diabetes in NOD mice, *Immunity*. (Band 20), Nr. 6, Seite 757-767. URL: PM:15189740

Oppenheim, D. E.; Roberts, S. J.; Clarke, S. L.; Filler, R.; Lewis, J. M.; Tigelaar, R. E.; Girardi, M. und Hayday, A. C. (2005): Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance, *Nature Immunology* (Band 6), Nr. 9, Seite 928-937. URL: ISI:000231369800023

Pabst, O.; Herbrand, H.; Willenzon, S.; Worbs, T.; Schippers, A.; Muller, W.; Bernhardt, G. und Forster, R. (2006): Enhanced FTY720-Mediated Lymphocyte Homing Requires G α_i Signaling and Depends on beta2 and beta7 Integrin, *J.Immunol.* (Band 176), Nr. 3, Seite 1474-1480. URL: PM:16424175

Pamer, E. G. (2004): Immune responses to *Listeria monocytogenes*, *Nat.Rev.Immunol.* (Band 4), Nr. 10, Seite 812-823. URL: PM:15459672

Papadakis, K. A.; Prehn, J.; Nelson, V.; Cheng, L.; Binder, S. W.; Ponath, P. D.; Andrew, D. P. und Targan, S. R. (2000): The role of thymus-expressed chemokine and its receptor CCR9 on lymphocytes in the regional specialization of the mucosal immune system, *J.Immunol.* (Band 165), Nr. 9, Seite 5069-5076. URL: PM:11046037

Pihlgren, M.; Dubois, P. M.; Tomkowiak, M.; Sjogren, T. und Marvel, J. (1996): Resting memory CD8⁺ T cells are hyperreactive to antigenic challenge in vitro, *The Journal of Experimental Medicine* (Band 184), Nr. 6, Seite 2141-2151. URL: PM:8976170

Pinschewer, D. D.; Ochsenbein, A. F.; Odermatt, B.; Brinkmann, V.; Hengartner, H. und Zinkernagel, R. M. (2000): FTY720 immunosuppression impairs effector T cell peripheral homing without affecting induction, expansion, and memory, *J.Immunol.* (Band 164), Nr. 11, Seite 5761-5770. URL: PM:10820254

Pope, C.; Kim, S. K.; Marzo, A.; Masopust, D.; Williams, K.; Jiang, J.; Shen, H. und Lefrancois, L. (2001): Organ-specific regulation of the CD8 T cell response to *Listeria monocytogenes* infection, *J.Immunol.* (Band 166), Nr. 5, Seite 3402-3409. URL: PM:11207297

Raulet, D. H.; Vance, R. E. und McMahon, C. W. (2001): Regulation of the natural killer cell receptor repertoire, *Annu.Rev.Immunol.* (Band 19), Seite 291-330. URL: PM:11244039

Rausch, A.; Hessmann, M.; Holscher, A.; Schreiber, T.; Bulfone-Paus, S.; Ehlers, S. und Holscher, C. (2006): Interleukin-15 mediates protection against experimental tuberculosis: a role for NKG2D-dependent effector mechanisms of CD8⁺ T cells, *Eur.J.Immunol.* (Band 36), Nr. 5, Seite 1156-1167. URL: PM:16619285

Reif, K. und Cyster, J. G. (2000): RGS molecule expression in murine B lymphocytes and ability to down-regulate chemotaxis to lymphoid chemokines, *J.Immunol.* (Band 164), Nr. 9, Seite 4720-4729. URL: PM:10779778

Robbins, S. H.; Nguyen, K. B.; Takahashi, N.; Mikayama, T.; Biron, C. A. und Brossay, L. (2002): Cutting edge: inhibitory functions of the killer cell lectin-like receptor G1 molecule during the activation of mouse NK cells, *J.Immunol.* (Band 168), Nr. 6, Seite 2585-2589. URL: PM:11884419

Robbins, S. H.; Terrizzi, S. C.; Sydora, B. C.; Mikayama, T. und Brossay, L. (2003): Differential regulation of killer cell lectin-like receptor G1 expression on T cells, *J.Immunol.* (Band 170), Nr. 12, Seite 5876-5885. URL: PM:12794113

Roberts, A. D.; Ely, K. H. und Woodland, D. L. (2005): Differential contributions of central and effector memory T cells to recall responses, *The Journal of Experimental Medicine* (Band 202), Nr. 1, Seite 123-133. URL: PM:15983064

Roberts, A. I.; Lee, L.; Schwarz, E.; Groh, V.; Spies, T.; Ebert, E. C. und Jabri, B. (2001): NKG2D receptors induced by IL-15 costimulate CD28-negative effector CTL in the tissue microenvironment, *J.Immunol.* (Band 167), Nr. 10, Seite 5527-5530. URL: PM:11698420

Rudolphi, A.; Bonhagen, K. und Reimann, J. (1996): Polyclonal expansion of adoptively transferred CD4⁺ alpha beta T cells in the colonic lamina propria of scid mice with colitis, *Eur.J.Immunol.* (Band 26), Nr. 5, Seite 1156-1163. URL: PM:8647181

Sallusto, F.; Lenig, D.; Forster, R.; Lipp, M. und Lanzavecchia, A. (1999): Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions, *Nature* (Band 401), Nr. 6754, Seite 708-712. URL: PM:10537110

Savage, P. A.; Boniface, J. J. und Davis, M. M. (1999): A kinetic basis for T cell receptor repertoire selection during an immune response, *Immunity.* (Band 10), Nr. 4, Seite 485-492. URL: PM:10229191

Shires, J.; Theodoridis, E. und Hayday, A. C. (2001): Biological insights into TCRgamma delta⁺ and TCRalpha beta⁺ intraepithelial lymphocytes provided by serial analysis of gene expression (SAGE), *Immunity.* (Band 15), Nr. 3, Seite 419-434. URL: PM:11567632

Slifka, M. K.; Pagarigan, R. R. und Whitton, J. L. (2000): NK markers are expressed on a high percentage of virus-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cells, *J.Immunol.* (Band 164), Nr. 4, Seite 2009-2015. URL: PM:10657652

Springer, T. A. (1994): Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm, *Cell* (Band 76), Nr. 2, Seite 301-314. URL: PM:7507411

Stewart, C. A.; Vivier, E. und Colonna, M. (2006): Strategies of natural killer cell recognition and signaling, *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* (Band 298), Seite 1-21. URL: PM:16329183

Stock, A. T.; Jones, C. M.; Heath, W. R. und Carbone, F. R. (2006): Cutting edge: central memory T cells do not show accelerated proliferation or tissue infiltration in response to localized herpes simplex virus-1 infection, *J.Immunol.* (Band 177), Nr. 3, Seite 1411-1415. URL: PM:16849445

Suresh, M.; Lanier, G.; Large, M. K.; Whitmire, J. K.; Altman, J. D.; Ruddle, N. H. und Ahmed, R. (2002): Role of lymphotoxin alpha in T-cell responses during an acute viral infection, *J.Virol.* (Band 76), Nr. 8, Seite 3943-3951. URL: PM:11907234

Suvas, S.; Azkur, A. K. und Rouse, B. T. (2006): Qa-1b and CD94-NKG2a interaction regulate cytolytic activity of herpes simplex virus-specific memory CD8⁺ T cells in the latently infected trigeminal ganglia, *J.Immunol.* (Band 176), Nr. 3, Seite 1703-1711. URL: PM:16424200

Svensson, M.; Marsal, J.; Ericsson, A.; Carramolino, L.; Broden, T.; Marquez, G. und Agace, W. W. (2002): CCL25 mediates the localization of recently activated CD8 α beta(+) lymphocytes to the small-intestinal mucosa, *J.Clin.Invest* (Band 110), Nr. 8, Seite 1113-1121. URL: PM:12393847

Trinchieri, G. (1989): Biology of natural killer cells, *Adv.Immunol.* (Band 47), Seite 187-376. URL: PM:2683611

Vance, R. E.; Jamieson, A. M. und Raulet, D. H. (1999): Recognition of the class Ib molecule Qa-1(b) by putative activating receptors CD94/NKG2C and CD94/NKG2E on mouse natural killer cells, *The Journal of Experimental Medicine* (Band 190), Nr. 12, Seite 1801-1812. URL: PM:10601355

Vance, R. E.; Kraft, J. R.; Altman, J. D.; Jensen, P. E. und Raulet, D. H. (1998): Mouse CD94/NKG2A is a natural killer cell receptor for the nonclassical major histocompatibility complex (MHC) class I molecule Qa-1(b), *The Journal of Experimental Medicine* (Band 188), Nr. 10, Seite 1841-1848. URL: PM:9815261

Vasseur, S.; Folch-Puy, E.; Hlouschek, V.; Garcia, S.; Fiedler, F.; Lerch, M. M.; Dagorn, J. C.; Closa, D. und Iovanna, J. L. (2004): p8 improves pancreatic response to acute pancreatitis by enhancing the expression of the anti-inflammatory protein pancreatitis-associated protein I, *J.Biol.Chem.* (Band 279), Nr. 8, Seite 7199-7207. URL: PM:14660681

Veiga-Fernandes, H. und Rocha, B. (2004): High expression of active CDK6 in the cytoplasm of CD8 memory cells favors rapid division, *Nat.Immunol.* (Band 5), Nr. 1, Seite 31-37. URL: PM:14647273

Voehringer, D.; Blaser, C.; Brawand, P.; Raulet, D. H.; Hanke, T. und Pircher, H. (2001): Viral infections induce abundant numbers of senescent CD8 T cells, *J.Immunol.* (Band 167), Nr. 9, Seite 4838-4843. URL: PM:11673487

von Andrian, Ulrich H. und Mempel, Thorsten R. (2003): HOMING AND CELLULAR TRAFFIC IN LYMPH NODES, *Nature Reviews Immunology* (Band 3), Nr. 11, Seite 867-878. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nri1222>

Wang, Z.; Benoit, G.; Liu, J.; Prasad, S.; Aarnisalo, P.; Liu, X.; Xu, H.; Walker, N. P. und Perlmann, T. (2003): Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors, *Nature* (Band 423), Nr. 6939, Seite 555-560. URL: PM:12774125

Wherry, E. J.; Teichgraber, V.; Becker, T. C.; Masopust, D.; Kaech, S. M.; Antia, R.; von Andrian, U. H. und Ahmed, R. (2003): Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets, *Nat.Immunol.* (Band 4), Nr. 3, Seite 225-234. URL: PM:12563257

Wiemann, Katrin; Mittrucker, Hans Willi; Feger, Ute; Welte, Stefan A.; Yokoyama, Wayne M.; Spies, Thomas; Rammensee, Hans Georg und Steinle, Alexander (2005): Systemic NKG2D Down-Regulation Impairs NK and CD8 T Cell Responses In Vivo, *The Journal of Immunology* (Band 175), Nr. 2, Seite 720-729. URL: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/abstract/175/2/720>

Wilhelm, P.; Riminton, D. S.; Ritter, U.; Lemckert, F. A.; Scheidig, C.; Hoek, R.; Sedgwick, J. D. und Korner, H. (2002): Membrane lymphotoxin contributes to anti-leishmanial immunity by controlling structural integrity of lymphoid organs, *Eur.J.Immunol.* (Band 32), Nr. 7, Seite 1993-2003. URL: PM:12115620

Wu, J.; Song, Y.; Bakker, A. B.; Bauer, S.; Spies, T.; Lanier, L. L. und Phillips, J. H. (1999): An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10, *Science* (Band 285), Nr. 5428, Seite 730-732. URL: PM:10426994

Wuensch, Sherry A.; Pierce, Robert H. und Crispe, I. Nicholas (2006): Local Intrahepatic CD8+ T Cell Activation by a Non-Self- Antigen Results in Full Functional Differentiation, *The Journal of Immunology* (Band 177), Nr. 3, Seite 1689-1697. URL: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/abstract/177/3/1689>

Xie, J. H.; Nomura, N.; Koprak, S. L.; Quackenbush, E. J.; Forrest, M. J. und Rosen, H. (2003): Sphingosine-1-phosphate receptor agonism impairs the efficiency of the local immune response by altering trafficking of naive and antigen-activated CD4+ T cells, *J.Immunol.* (Band 170), Nr. 7, Seite 3662-3670. URL: PM:12646631

Yu, P.; Spiotto, M. T.; Lee, Y.; Schreiber, H. und Fu, Y. X. (2003): Complementary role of CD4+ T cells and secondary lymphoid tissues for cross-presentation of tumor antigen to CD8+ T cells, *The Journal of Experimental Medicine* (Band 197), Nr. 8, Seite 985-995. URL: PM:12695490

Zabel, B. A.; Agace, W. W.; Campbell, J. J.; Heath, H. M.; Parent, D.; Roberts, A. I.; Ebert, E. C.; Kassam, N.; Qin, S.; Zovko, M.; LaRosa, G. J.; Yang, L. L.; Soler, D.; Butcher, E. C.; Ponath, P. D.; Parker, C. M. und Andrew, D. P. (1999): Human G protein-coupled receptor GPR-9-6/CC chemokine receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes, and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokine-mediated chemotaxis, *The Journal of Experimental Medicine* (Band 190), Nr. 9, Seite 1241-1256. URL: PM:10544196

Zammit, D. J.; Cauley, L. S.; Pham, Q. M. und Lefrancois, L. (2005): Dendritic cells maximize the memory CD8 T cell response to infection, *Immunity*. (Band 22), Nr. 5, Seite 561-570. URL: PM:15894274

Zhou, P.; Hwang, K. W.; Palucki, D.; Kim, O.; Newell, K. A.; Fu, Y. X. und Alegre, M. L. (2003): Secondary lymphoid organs are important but not absolutely required for allograft responses, *Am.J.Transplant.* (Band 3), Nr. 3, Seite 259-266. URL: PM:12614279

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------|
| Ak | Antikörper |
| APZ | Antigen-präsentierende-Zelle |
| BfR | Bundesbehörde für Risikoforschung |
| BP | biologisches Produkt (Gene Ontology Term) |
| BSA | Rinder-Serum-Albumin (bovine serum albumin) |
| BZR | B-Zell-Rezeptor |
| CCR | Chemokinrezeptor |
| CD | Differenzierungsmarker (cluster of differentiation) |
| CFSE | 5-,6-Carboxyfluorescein-diacetat-succinimidylester |
| C57BL/6 | Inzucht-Mausstamm |
| DAVID | <i>Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery</i> |
| DC | Dendritische Zelle (dendritic cell) |
| FACS | durchflusszytometrische Zellsortierung (fluorescence activated cell sorting) |
| GALT | Darm-Assoziiertes-Lymphoides-Gewebe (gut associated lymphoid tissue) |
| GO | <i>gene ontology</i> |
| HEV | Hochendotheliale Venen |
| ICAM | <i>intercellular adhesion molecules</i> |
| IEL | intraepitheliale Lymphozyten |
| IFN γ | Interferon- γ |
| ig | intragastrisch |
| IL | Interleukin |
| iv | intravenös |
| LCMV | <i>Lymphozytäres Choriomeningitis</i> |
| LFA-1 | <i>leukocyte functional antigen 1</i> |
| LLO | Listeriolysin-O |
| Lm | <i>Listeria monocytogenes</i> |
| LmOVA | rekombinante Lm, die verkürztes Ovalbumin sekretieren |
| LPL | Lamina Propria Lymphozyten |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| LT | Lymphotoxin |
| LTbR | Lymphotoxin-b-Rezeptor |

| | |
|----------|--------------------------------------------------------------------------|
| MACS | magnetische Zellsortierung (magnetic activated cell sorting) |
| MAdCAM1 | <i>mucosal vascular addressin cell-adhesion moleküle 1</i> |
| mAk | monoklonaler Antikörper |
| MALT | Mukosa-assoziertes-lymphoides-Gewebe (mucosa associated lymphoid tissue) |
| MAPK | Mitogen-aktivierte Proteinkinase |
| MHC | Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex) |
| MLN | mesenterische Lymphknoten (mesenteric lymphnodes) |
| NKR | NK-Zell-Rezeptor |
| NK-Zelle | natürliche Killerzelle |
| OVA | Ovalbumin |
| PLN | periphere Lymphknoten |
| PP | Peyer-Plaques |
| PNADs | <i>peripheral-node addressins</i> |
| PBS | physiologischer Phosphatpuffer (phosphate buffered saline) |
| SD | Standardabweichung (standard deviation) |
| SPF | <i>Specific Pathogen Free</i> |
| TGFb | <i>transforming growth factor b</i> |
| TLR | <i>toll like receptor</i> |
| TNFa | Tumor-Nekrosis-Faktor-a |
| TSB | Tryptic-Soy-Broth-Medium |
| TZR | T-Zell-Rezeptor |

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker für die engagierte Betreuung. Die konstruktiven Diskussionen mit ihm, seine Anregungen und Kritik, sowie die unermüdliche Unterstützung bei der Planung und Durchführung von Versuchen, haben diese Arbeit entscheidend vorangetrieben.

Großer Dank gilt auch Prof. Dr. Stefan H. E. Kaufmann für die Möglichkeit, diese Arbeit in einer großartigen wissenschaftlichen Umgebung anzufertigen. Außerdem danke ich ihm für seine Unterstützung und für die kompetente Betreuung.

Bei Prof. Dr. Richard Lucius bedanke ich mich herzlich für seine Bereitschaft, diese Arbeit von Seiten der Humboldt-Universität zu betreuen.

Misho Kursar danke ich für die Einarbeitung in viele der hier angewandten Methoden, sowie für wertvolle, motivierende Diskussionen und seine konstruktive Kritik.

Anne Köhler, Peggy Mex, Doris Lazar, Delia Miekley, Marion Krause und Jessica Bigot danke ich für ihre unschätzbare Hilfe im Labor, insbesondere bei den umfangreicheren Experimenten, die ohne diese Unterstützung nicht möglich gewesen wären. Bedanken möchte ich mich außerdem bei Toralf Kaiser und Katharina Raba für die Hilfe bei den FACS-Sorts, sowie bei Hans-Joachim Mollenkopf und besonders bei Karin Hanke für die großartige Unterstützung bei der Durchführung der Mikroarray-Analysen. Dank schulde ich auch Robert Hurwitz, Ralf Winter und Ulrike Erben für die Hilfe bei der Tetramerproduktion. Ferner danke ich allen Tierpflegern für die Betreuung und Zucht der Mäuse. Ulrich Steinhoff und Silke Behnck danke ich für das Überlassen der gnotobiotischen Mäuse und Nicole Schmidt für das Bereitstellen der CD4dnTGFβRII Mäuse. Dem SFB633 danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Für das Korrekturlesen meiner Arbeit danke ich Hans-Willi-Mittrücker, Michel, Kathrin und Claudia Jänner und Sabine Seibert.

Danken möchte ich auch allen übrigen Kollegen, die mir mit Ideen, Vorschlägen und vor allem auch durch das Schaffen einer herzlichen und inspirierenden Arbeitsatmosphäre weitergeholfen haben. Hier sind besonders Markus Koch, Markus Niemeyer und das gesamte Office 3.61 zu nennen.

Alina Cordis und Sandra Rohner waren während meiner Promotionszeit immer für mich da und haben mich in jeder Hinsicht unterstützt und ermutigt, wofür ich ihnen sehr dankbar bin.

Ganz besonders und herzlich bedanke ich mich bei Sabine Seibert. Danke für die vielen Tipps, Anregungen und fruchtbaren Diskussionen, vor allem aber für die Freundschaft!

Der größte Dank gilt meinen Eltern und meinen Schwestern für ihre Unterstützung, den Rückhalt und all die mir eröffneten Möglichkeiten, die mir das Anfertigen dieser Arbeit ermöglicht haben.

Herstellerverzeichnis

| Hersteller | | Adresse | | URL |
|----------------------------------------------------|--|----------------------------------|--|------------------------|
| Agilent Technologies | | Herrenberger Strasse 130 | | www.agilent.com |
| Deutschland GmbH | | D-71034 Böblingen | | |
| Ambion | | 2130 Woodward | | www.ambion.com |
| | | Austin, TX 78744-1832, USA | | |
| Arcturus Bioscience | | 400 logue Avenue | | www.arctur.com |
| | | Mountain View, California | | |
| | | 94042, USA | | |
| Avidity | | 1899 Gaylord Street | | www.avidity.com |
| | | Denver, CO 80206, USA | | |
| Bayer AG | | D-51368 Leverkusen | | www.bayer.com |
| Becton Dickinson GmbH | | Tullastrasse 8-12 | | www.bdbiosciences.com |
| (BD Biosciences) | | D-69126 Heidelberg | | |
| Biochrom Labs, Inc. | | 1719 South 13th Street | | www.biochrom.com |
| | | P.O. Box 996 | | |
| | | Terre Haute, IN 47808, USA | | |
| Bundesbehörde für Risikoforschung | | Diedersdorfer Weg 1 | | www.bfr.bund.de |
| De Novo Software | | D - 12277 Berlin | | |
| | | 64 McClintock Crescent | | www.denovosoftware.com |
| | | Thornhill, Ontario L4J 2T1 | | |
| | | Canada | | |
| eBioscience | | 6042 Cornerstone Court West | | www.ebioscience.com |
| | | San Diego, CA 92121, USA | | |
| Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin | | Charité-Campus Benjamin Franklin | | www.charite.de/fem |
| | | Krahmerstr. 6 | | |
| | | D-12207 Berlin | | |
| Invitrogen GmbH: einschließlich der Marken | | Technologiepark Karlsruhe | | www.invitrogen.com |
| Gibco und Molecular Probes | | Emmy-Noether-Strasse 10 | | |
| Jackson ImmunoResearch Europe | | D-76131 Karlsruhe | | |
| | | Unit 7, Acorn Business Center, | | www.jireurope.com |
| | | Oaks Drive | | |
| | | Newmarket, Suffolk, | | |
| | | UK CB8 7SY | | |
| The Jackson Laboratory | | 600 Main Street | | www.jax.org |
| | | Bar Harbor, Maine 04609, | | |
| | | USA | | |
| JPT Peptide Technologies GmbH | | Volmerstrasse 5 (UTZ) | | www.jpt.com |
| | | 12489 Berlin, Germany | | |
| Merck | | Frankfurter Strasse 250 | | www.merck.de |
| | | D-64293 Darmstadt | | |
| Millipore GmbH | | Am Kronberger Hang 5 | | www.millipore.de |
| | | D-65824 Schwalbach | | |
| Miltenyi Biotec GmbH | | Friedrich-Ebert-Straße 68 | | www.miltenyibiotec.com |
| | | D-51429 Bergisch Gladbach | | |
| New England Biolabs GmbH (NEB) | | Bruningstrasse 50 Geb.G810 | | www.neb.com |
| | | D-65926 Frankfurt am Main | | |

| Hersteller | | | Adresse | URL |
|----------------------------------------------|--------------|------|---------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Novartis International AG | | | CH-4002 Schweiz | Basel www.novartis.ch |
| PAA | Laboratories | GmbH | Haidmannweg A-4061 Östereich | 9 www.paa.com Pasching |
| Pfizer | Pharma | GmbH | Pfizerstraße D-76139 Karlsruhe | 1 www.pfizer.de |
| QIAGEN GmbH | | | QIAGEN Strasse D-40724 Hilden | 1 www.qiagen.com |
| Roche | Diagnostics | GmbH | Sandhofer Strasse 116 D-68305 Mannheim | www.roche-applied-science.com |
| Roche Applied Science Rosetta Biosoftware | | | 401 Terry Avenue Seattle, WA 98109, USA | N www.rosettabio.com |
| Carl Roth GmbH & Co.KG | | | Schoemperlenstrasse 1-5 D-76185 Karlsruhe | www.carl-roth.de |
| Sigma-Aldrich Chemie GmbH | | | Eschenstrasse 5 D-82024 Taufkirchen München | www.sigmaaldrich.com bei |

Publikationen

Eingereichte Publikationen und Publikationen in Vorbereitung

Kursar, M. und Jänner, N.; Pfeffer, K.; Brinkmann, V.; Kaufmann, S.H.E.; Mittrücker, H-W.
Requirement of secondary lymphoid tissues for the induction of primary and secondary
T cell responses against *Listeria monocytogenes*. Eingereicht

Jänner, N.; Kaufmann, S.H.E.; Mittrücker, H-W.
Intestine specific regulation of lectin-like NK-receptors on CD8⁺ T cells. In Vorbereitung

Kongressbeiträge

36. Jahrestagung der DGfI (Deutsche Gesellschaft für Immunologie) in Kiel (21.-24.09.2005)
Posterpräsentation

EIMID (European Initiative For Basic Research In Microbiology And Infectious Disease)
meeting, Gällöfsta Sweden (28.-30. 10. 2005)
Posterpräsentation

Development and Function of Secondary and Tertiary Lymphoid Tissues, Institut Pasteur
Paris Frankreich (03.-5.09.2006)
Posterpräsentation

16. European Congress of Immunology, Paris Frankreich (06.-09.09.2006)
Posterpräsentation

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfen und Hilfsmittel angefertigt zu haben.

Ich habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze einen entsprechenden Doktorgrad nicht.

Ich erkläre die Kenntnisnahme der dem Verfahren zugrunde liegenden Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin.